

**Charakterisierung der Multidrug-Efflux-
Transporter NorM und AcrAB in *Erwinia amylovora***

DISSERTATION

**zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg**



**vorgelegt von
Antje Burse
aus
Neuhaus am Rennweg**

Marburg/Lahn 2003

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bp	Basenpaare
CFBP	Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes
cfu	„colony forming unit“ (koloniebildende Einheit)
cv.	Kultivar
demin.	demineralisiert
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA-Ribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
gDNA	genomische DNA
GSPB	Göttinger Sammlung phytopathogener Bakterien
GUS	β-Glucuronidase
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
mRNA	messenger RNA
OD₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge von 600 nm
ORF	„open reading frame“ (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pv.	Pathovar
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
subsp.	Subspecies
TE	Tris/EDTA
U	Unit (Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galaktosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-β-D-Glucuronsäure

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	<i>Erwinia amylovora</i>	3
2.2	Pflanze-Pathogen-Interaktionen.....	8
2.3	Resistenzmechanismen in Phytopathogenen.....	11
2.3.1	Multidrug-Efflux	12
2.3.2	Resistenzmechanismen in <i>E. amylovora</i>	17
2.4	Zielsetzung	19
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Bakterienstämme.....	21
3.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
3.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	21
3.1.3	<i>E. amylovora</i> - und andere pflanzenassoziierte Bakterien-Stämme.....	22
3.1.4	Kultivierung von <i>E. amylovora</i> - und anderen pflanzenassoziierten Bakterien-Stämmen.....	23
3.1.5	Stammhaltung.....	23
3.2	Enzymaktivitätsbestimmung	24
3.2.1	Qualitativer β -Glucuronidase-Nachweis	24
3.2.2	Quantitativer β -Glucuronidase-Nachweis	24
3.2.3	Proteinbestimmung.....	25
3.3	Isolation von Nukleinsäuren	26
3.3.1	Isolation von Plasmid-DNA	26
3.3.1.1	Alkalische Lyse	26
3.3.1.2	„Boiling lysis“	27
3.3.1.3	Isolation natürlicher Plasmide aus <i>Pantoea agglomerans</i>	27
3.3.2	Isolation genomischer DNA.....	28
3.3.3	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	28
3.4	Elektrophorese- und Transfertechniken	29
3.4.1	DNA-Agarosegelelektrophorese	29
3.4.2	DNA-Transferblot (Southernblot).....	29
3.4.2.1	DNA-Markierung mit Digoxigenin.....	29
3.4.2.2	Southernblot-Hybridisierung.....	30
3.5	Klonierungstechniken.....	31
3.5.1	Vektoren/Plasmide	32
3.5.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen	33
3.5.2.1	Transformation in CaCl_2 -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
3.5.2.2	Transformation in elektrokompente Zellen.....	34
3.6	Polymerase-Ketten-Reaktion	34
3.7	Mutagenese durch Rekombination	36

3.7.1	Sequenzspezifische Rekombination.....	36
3.7.2	Unspezifische Rekombination durch Transposoninsertion.....	37
3.7.3	Unspezifische Rekombination durch den Bakteriophagen Mu.....	38
3.8	Physiologische Charakterisierung von NorM und AcrB von <i>E. amylovora</i>.....	40
3.8.1	Substratspezifität von NorM und AcrB.....	40
3.8.1.1	Mikrodilutionstest.....	41
3.8.1.2	Agarplattendiffusionstest.....	42
3.9	Flavonoidextraktion aus Pflanzenblättern.....	42
3.10	Pathogenitätstest an Tabak.....	43
3.11	Virulenztest an Apfel.....	43
3.11.1	Inokulation der Pflanzen durch Prick-Technik.....	43
3.11.2	Bestimmung der Bakterienpopulation <i>in planta</i>	44
3.12	Quantifizierung von Promotoraktivitäten durch das Reportergen <i>egfp</i>.....	44
3.13	Isolation von Epiphyten.....	45
3.14	Antibiotika-Produktion der Epiphyten.....	45
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	Temperaturabhängige Genexpression in <i>E. amylovora</i>.....	47
4.2	Klonierung zweier Multidrug-Efflux-Transporter aus <i>E. amylovora</i>.....	52
4.2.1	Klonierung von <i>norM</i> aus <i>E. amylovora</i>	53
4.2.2	Analyse der Nukleotidsequenz des Inserts von pBBR.mde6.....	54
4.2.3	Klonierung von <i>acrAB</i> aus <i>E. amylovora</i>	60
4.2.4	Analyse der Nukleotidsequenz des Inserts von pBBR.acr2.....	61
4.3	Heterologe Expression von <i>norM</i> und <i>acrB</i> in <i>E. coli</i> KAM3.....	69
4.4	Verbreitung von <i>norM</i> und <i>acrB</i> in <i>E. amylovora</i>- und verwandten Bakterienstämmen.....	72
4.5	Herstellung von <i>norM</i>- und <i>acrB</i>-Mutanten von <i>E. amylovora</i>.....	74
4.5.1	Herstellung von <i>norM</i> -Mutanten von <i>E. amylovora</i>	75
4.5.2	Herstellung von <i>acrB</i> -Mutanten von <i>E. amylovora</i>	77
4.6	Wirkung antimikrobieller Substanzen auf die <i>norM</i>- und die <i>acrB</i>-Mutante von <i>E. amylovora</i> ...	78
4.7	Test von Blattextrakten im Agarplattendiffusionstest.....	81
4.8	Hypersensitive Reaktion an Tabak.....	83
4.9	Virulenztest der Mutanten an Apfelpflanzen.....	84
4.10	Transkriptionelle Regulation von <i>acrAB</i> und <i>acrR</i>.....	86
4.11	Hemmung des Wachstums von <i>E. amylovora</i> durch Epiphyten.....	89
4.11.1	Isolation Antibiotika-produzierender Epiphyten.....	89
4.11.2	Charakterisierung der Epiphyten.....	91
4.11.3	Transposon-Mutagenese von <i>P. agglomerans</i> 2b/89.....	94
5	DISKUSSION.....	96
5.1	Identifizierung und Charakterisierung der Multidrug-Efflux-Transporter NorM und AcrAB....	97
5.2	Einfluss von AcrAB und NorM auf die Pflanze-Pathogen-Interaktion.....	106

5.3	Regulation von AcrAB.....	109
5.4	Einfluß von AcrAB und NorM auf die Interaktion mit anderen Mikroorganismen.....	112
5.5	Ausblick.....	115
6	LITERATUR.....	116

1 ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen sind permanent phytopathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Jedoch wird eine Erkrankung meistens durch die pflanzliche Abwehr vereitelt. Ein wichtiger Abwehrmechanismus ist die Synthese toxischer Sekundärmetabolite, die an der Infektionsstelle gebildet und freigesetzt werden. In einer kompatiblen Pathogen-Pflanzen-Interaktion muss das Pathogen der Wirkung dieser Toxine widerstehen. Dabei kann eine Akkumulation der Toxine in der Zelle durch aktiven Efflux verhindert werden. Dieser erfolgt beispielsweise durch Multidrug-Efflux-Proteine, die unspezifisch ein breites Spektrum an Substanzen aus der Zelle schleusen. Dass Multidrug-Efflux-Pumpen für die Virulenz von Bedeutung sind, konnte bisher nur bei pilzlichen Pathogenen gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Transporter, AcrAB und NorM, in dem Gram-negativen Bakterium *E. amylovora*, dem Erreger des Feuerbrandes an Rosengewächsen, identifiziert sowie genetisch und biochemisch charakterisiert. AcrAB gehört der RND-Familie und NorM der MATE-Familie sekundärer Transporter an. Das AcrAB-Transportsystem aus *E. amylovora* exportiert unterschiedliche lipophile und amphiphile Substanzen. Im Gegensatz zu NorM, für das hydrophobe Kationen als Substrat nachgewiesen wurden, besitzt AcrAB ein breiteres Substratspektrum.

Virulenztests an Apfelpflanzen zeigten eine verminderte Virulenz der *acrB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Erstmals deutet dies daraufhin, dass ein Multidrug-Efflux-Protein bei einer Bakteriose eine Rolle spielt. Apfelblattextrakte besaßen eine Hemmwirkung auf die *acrB*-Mutante, die weder beim Wildtyp noch bei der *norM*-Mutante auftrat. Zugabe der Phytoalexine Phloretin, Quercetin, Naringenin und (+)-Catechin bewirkten ein deutlich vermindertes Wachstum der *acrB*-Mutante. Weiterhin konnte eine ~3fache Induktion der *acrAB*-Transkription durch Phloretin nachgewiesen werden. Mit AcrAB wurde somit ein Multidrug-Efflux-Transporter als Virulenzfaktor eines bakteriellen Phytopathogens identifiziert, der durch ein Phytoalexin induzierbar ist. Im Gegensatz dazu scheint NorM eine Funktion während der epiphytischen Besiedlung der Wirtspflanze in der Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen zu besitzen. Es konnte eine deutliche Hemmung der *norM*-Mutante durch Antibiotika des epiphytischen Bakteriums *P. agglomerans* nachgewiesen werden. Da der Epiphyt und das Pathogen im selben Habitat vorkommen, hat sich möglicherweise in *E. amylovora* durch koevolutive Prozesse ein Resistenzmechanismus gegen die Toxine von *P. agglomerans* in Form des Multidrug-Effluxes entwickelt. Des weiteren wurde eine ~2fach induzierte Genexpression von *norM* bei 18°C im Vergleich zu 28°C ermittelt. In gemäßigten Klimazonen korreliert niedrige Temperatur mit hoher Luftfeuchte und der Bildung von

Wasserfilmen auf Pflanzenoberflächen, die eine Bewegung des Pathogens zu natürlichen Öffnungen oder Verwundungen ermöglicht. Durch niedrige Temperaturen werden somit günstige Bedingungen für die Besiedlung der Pflanze durch *E. amylovora*, gleichzeitig aber auch die Notwendigkeit zur Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen, wie z. B. *P. agglomerans*, erzeugt.

2 EINLEITUNG

Phytopathogene Krankheitserreger haben sich im Laufe der Evolution an ihren Wirt angepasst. Sie sind in der Lage, in eine Pflanze einzudringen, sich im Gewebe zu vermehren und sich bei der Besiedlung des Wirts ohne dessen Gegenleistung von ihm zu ernähren. Durch Beeinflussung des Stoffwechsels und Veränderungen der Zellstruktur der Pflanze kommt es zur Entstehung von Krankheitssymptomen. Die Ausprägung einer Erkrankung ist abhängig von der Widerstandskraft des Wirtes (Resistenz) und der Angriffsfähigkeit des Erregers (Virulenz). Je nach Grad der Anpassung besitzen Phytopathogene ein unterschiedliches Wirtsspektrum (Schlösser, 1983).

2.1 *Erwinia amylovora*

E. amylovora (Burrill) Winslow et al., der Erreger des Feuerbrandes, besitzt einen engen Wirtspflanzenkreis und befällt vorrangig Pflanzenarten aus der Subfamilie *Maloideae* der Familie der Rosengewächse (Momol & Aldwinkle, 2000). Die Erkrankung äußert sich durch das Auftreten von Nekrosen an verschiedenen Pflanzenteilen und ist insbesondere beim Apfel- und Birnenanbau von wirtschaftlicher Bedeutung. Bei dem Pathogen handelt es sich um ein stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Gram-negatives Bakterium, das der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet wird (Paulin, 2000). Eine 16S rDNA-Analyse der pflanzenassoziierten Gattungen dieser Familie von Hauben et al. (1998) ergab die Unterteilung der Gattung *Erwinia* in vier phylogenetische Gruppen. Durch diese Arbeit wurden einige vormalige *Erwinia*-Arten anderen Genera zugeordnet. *E. amylovora* stellt in morphologischer, physiologischer und serologischer Hinsicht eine homogene Art dar (Paulin, 2000). Allerdings wurde durch den Einsatz molekularbiologischer Techniken in den letzten Jahren eine genetische Diversität bei Isolaten von verschiedenen Wirtspflanzen und unterschiedlicher geographischer Herkunft entdeckt (Jock et al., 2002; Momol & Aldwinkle, 2000).

Feuerbrand stammt ursprünglich aus dem US-Bundesstaat New York (Hudson Valley) und hat sich seit 220 Jahren von dort aus in über 40 Ländern verbreitet (Denning, 1794). *E. amylovora* ist das erste Bakterium, das überhaupt als Auslöser einer Pflanzenkrankheit beschrieben wurde (Burrill, 1883). Epidemien mit z. T. großen ökonomischen Verlusten sind aus Nord- und Mittelamerika, dem ostasiatischen Raum, Europa und dem östlichen Mittelmeerraum bekannt (Bonn & van der Zwet, 2000). In der südlichen Hemisphäre tritt Feuerbrand nur in Neuseeland auf. Nach dem 2. Weltkrieg erreichte die Krankheit Europa und

wurde 1971 zum ersten mal in Deutschland beschrieben (Zeller, 1974). Im Zeitraum von 1993-1996 mussten aufgrund massiven *E. amylovora*-Befalls pro Jahr etwa 200 ha Obstbäume gerodet werden. Inzwischen sind Ausbrüche von wirtschaftlicher Bedeutung noch aus Anbaugebieten in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg, insbesondere aus der Bodensee-Region, bekannt (Dr. E. Moltmann, Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart, persönl. Mitteilung).

Das Feuerbrandpathogen kann sich in allen Teilen seiner Wirtspflanze ausbreiten. Unter günstigen Bedingungen befällt das Bakterium die gesamte Pflanze, die dadurch innerhalb der Vegetationsperiode absterben kann (Thomson, 2000). *E. amylovora* dringt in seine Wirtspflanze durch natürliche Öffnungen, wie Stomata, Hydathoden, Nektarien oder Lentizellen ein. Verwundungen können ebenfalls als Infektionsstelle dienen (Eden-Green & Billing, 1974). Die Übertragung der Bakterien geschieht durch Insekten, insbesondere Bienen, sowie durch Vögel, Wind, Regen oder mechanische Kulturmaßnahmen (Emmett & Baker, 1971; McManus & Jones, 1994; Seidel et al. 1994). Die Primärinfektion einer Pflanze erfolgt meist über die Blüte und in geringerem Maße über junge Triebe (Abb. 1.) (Wilson et al., 1989a; 1989b). Gelangt das Pathogen auf eine Blüte, ist es in der Lage, auf der Narbe des Pistils eine hohe Populationsdichte zu erreichen, obwohl es generell an eine epiphytische Lebensweise schlecht angepasst ist (Miller, 1984). Die hohe Bakterienzahl auf der Narbe gewährleistet eine erfolgreiche Infektion der Pflanze und zusätzlich die weitere Verbreitung auf andere Blüten durch Insekten (Thomson, 1986). Die Infektion einer Blüte selbst geschieht meistens durch die Kontamination der Nektarien des Blütenbodens. In dem darunter liegenden Gewebe siedelt sich *E. amylovora* im Interzellularraum an, und es treten erste Symptome auf: wasserdurchtränkte Bereiche und Nekrosen (Vanneste & Eden-Green, 2000). Die Ausbreitung innerhalb der Pflanze erfolgt zunächst im Interzellularraum des Corticalparenchyms und schließlich systemisch im Xylem und Phloem des Leitgewebesystems (Bogs et al., 1998). Im Xylem kann die Vermehrung der Bakterien, bei gleichzeitiger starker Bildung von Exopolysacchariden zu einer Verringerung bzw. sogar einem Verschluss der Wasserleitung führen (Sjulin & Beer, 1977). Die Folge sind Welkesymptome. Die Zellen des Rindenparenchyms in der Nachbarschaft der Leitbündel zeigen Plasmolyseerscheinungen, eine Desorganisation der Zellorganellen und kollabieren schließlich. Die entstehenden lysogenen Hohlräume ermöglichen eine laterale Ausbreitung der Bakterien, was zu ausgedehnten Nekrosen führt. *E. amylovora* produziert weder pektinolytische Enzyme noch Phytotoxine, so dass die Ursache für die Plasmolyseerscheinungen noch unklar ist (Seemueller & Beer, 1976).

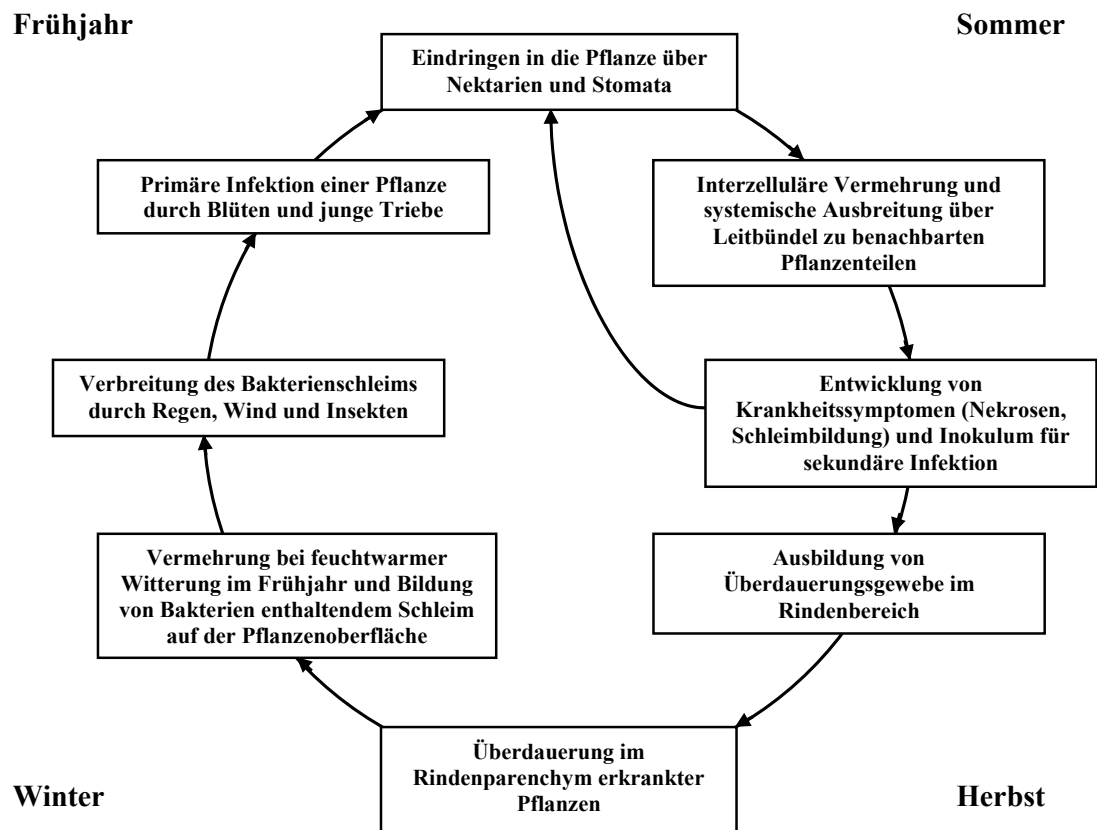


Abb. 1. Verlauf einer *E. amylovora* - Infektion im jahreszeitlichen Wechsel.

Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf sind die befallenen Zweige und Blätter schwarz verfärbt und vollständig ausgetrocknet, wodurch eine Ähnlichkeit zu Brandschäden entsteht, was sich in der Namensgebung widerspiegelt (van der Zwet & Beer, 1995). Für den Feuerbrand besonders typisch ist die krückstockartige Krümmung der Triebspitze, sowie der Austritt eines milchig-weißen Exudats aus dem pflanzlichen Gewebe (Abb. 2). Dieses Exudat besteht hauptsächlich aus von *E. amylovora* produziertem Exopolysaccharid, in das die Bakterien eingebettet sind. Es kann als Quelle für Sekundärinfektionen dienen (Thomson, 2000).

Wenn bei trockener, kalter Witterung die Ausbreitung des Feuerbrands zum Stillstand kommt, bildet sich auf Grund des Einschrumpfens der befallenen Rindenbereiche eine deutliche Grenzzone zwischen gesundem und krankem Gewebe aus (Beer & Norelli, 1977). In solchen Bereichen können die Bakterien in latenter Form überwintern und sich im nächsten Frühjahr erneut vermehren. Der damit verbundene Exudataustritt stellt ein potentielles Inokulum für neue Primärinfektionen über die oben genannten Übertragungswege dar.

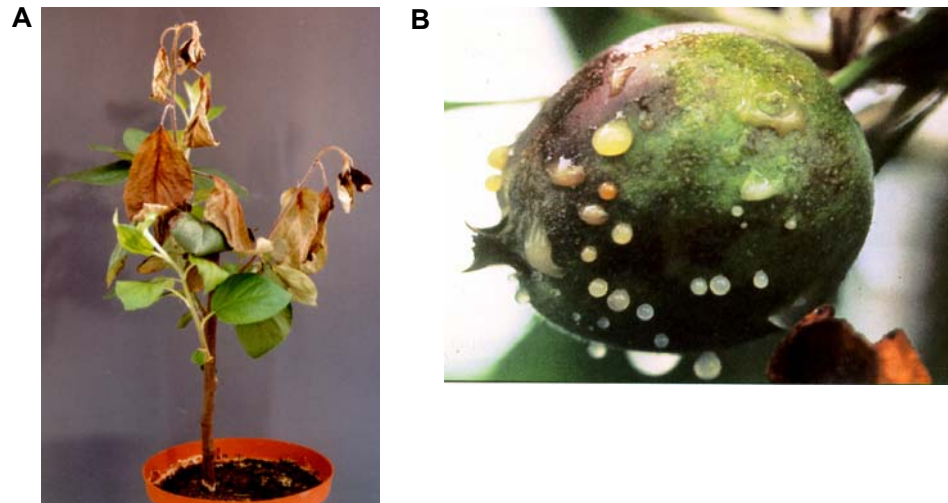


Abb. 2. Feuerbrandsymptome an Apfel verursacht durch *E. amylovora*. (A) Nekrose und Krümmung der Triebspitzen. (B) Schleimproduktion an Apfelfrucht.

In den letzten 20 Jahren konnten mit der Entwicklung molekularbiologischer Methoden zwei wichtige Faktoren identifiziert werden, die für die Pathogenese des Feuerbrandes notwendig sind (Eastgate, 2000). Dabei handelt es sich um das extrazelluläre Polysaccharid Amylovoran und um Effektorproteine, die durch einen Typ III-Sekretionsmechanismus direkt in die Pflanzenzelle transportiert werden. Die Effektorproteine greifen in den pflanzlichen Metabolismus oder in Signaltransduktionskaskaden ein. Einige dieser Proteine sind in die Auslösung einer sog. hypersensitiven Reaktion (HR) bei inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktionen und bei der Pathogenese in der Wirtspflanze involviert (Lam et al., 2001). Die HR ist eine lokale Abwehrreaktion der Pflanze, die durch einen programmierten Zelltod an der Infektionsstelle gekennzeichnet ist. Hierbei kommt es zur Entstehung einer nur mikroskopisch erkennbaren Nekrose, wodurch eine weitere Pathogenausbreitung in unbefallenes Gewebe verhindert wird.

Die *E. amylovora* *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity)-Gene sind in einer Pathogenitätsinsel organisiert und kodieren für regulatorische, sekretorische und sekretierte Proteine (Kim & Beer, 2000). Die *hrp*-Genexpression in *E. amylovora* ist von verschiedenen Umweltbedingungen abhängig. So wurde eine erhöhte Expression bei einem niedrigen pH und einer niedrigen Temperatur nachgewiesen (Wei et al., 1992). Eine Aktivierung der *hrp*-Transkription erfolgt durch den alternativen Sigmafaktor HrpL, der an ein konserviertes Sequenzmotiv upstream von HrpL-regulierten Genen, die sog. *hrp*-Box, bindet (Wei & Beer, 1995). Seine Expression selbst wird durch das σ^{54} /HrpS-System sowie einem aus HrpX und HrpY bestehenden Zwei-Komponentensystem reguliert (Wei et al., 2000). Die sekretorischen

Proteine formieren sich zu einer Pilus-ähnlichen Struktur und erlauben eine Translokation von Effektorproteinen via Typ III-Sekretion in den Interzellularraum des Pflanzengewebes oder direkt in die Zelle (Jin et al., 2001). Zu den sekretierten Proteinen zählen die Harpine HrpN und HrpW, die eine HR und eine systemische Resistenz induzieren können (Alfano & Collmer, 1997). Ihre genaue Rolle bei der Pathogenese blieb bisher allerdings ungeklärt. Des weiteren wird das Protein DspE mittels Hrp-Pilus sekretiert. Der *dsp* (disease specific)-Locus befindet sich stromabwärts der *hrp*-Gene und wird HrpL-abhängig reguliert (Bogdanove et al., 2000). DspE und DspF sind für die Pathogenese, nicht jedoch für eine HR-Auslösung notwendig. DspE ähnelt dem Avirulenzprotein AvrE aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und interagiert wahrscheinlich mit sog. Resistenzproteinen der Wirtspflanze (Gaudriault et al., 1997). DspF ist als Chaperon an der Sekretion von DspE beteiligt.

Ein zweiter Pathogenitätsfaktor von *E. amylovora* ist die Produktion von Exopolysacchariden (EPS), die eine Kapsel um die Bakterienzelle bilden. EPS und Zellen sind Bestandteile des Exudats, das auf der Oberfläche befallener Pflanzen austritt und zur weiteren Verbreitung des Pathogens dient. Zusätzlich kommt es durch EPS zur Verringerung des Wasserflusses in den Leitbündeln der Pflanze, wodurch Welkesymptome auftreten können (Geider, 2000).

Mutanten von *E. amylovora*, die nicht mehr in der Lage sind, das EPS Amylovoran zu synthetisieren, verhalten sich apathogen (Bellemann & Geider, 1992). Die vom EPS gebildete Kapsel erschwert die Pathogenerkennung und eine folgende Abwehrreaktion durch die Pflanze (Geider, 2000). Zusätzlich werden Wasserverluste limitiert und Nährstoffe gebunden. *E. amylovora* ist zur Synthese von zwei verschiedenen EPS-Typen befähigt, dem neutralen Homopolysaccharid Levan und dem sauren Heteropolysaccharid Amylovoran, wobei letzteres die Hauptkomponente des Kapsel-EPS darstellt. Amylovoran setzt sich aus über 1000 Einheiten pro Molekül zusammen (Jumel et al., 1997). Eine Einheit wird aus drei Galaktose-Resten und einer Seitenkette gebildet, die aus Glucuronsäure und einem mit Pyruvat und Acetat substituierten Galaktose-Rest besteht (Geider, 2000). Die für die komplizierte Struktur des Amylovoran verantwortlichen Synthese-Proteine werden von sog. *ams*-Genen kodiert, die fast alle in einem etwa 17 kb umfassenden Operon organisiert sind (Bugert & Geider, 1997). Die Regulation erfolgt in Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen, wobei ein Zwei-Komponentensystem eine besondere Rolle spielt (Bereswill & Geider, 1997; Bernhard et al., 1990; Chatterjee et al., 1990; Coleman et al., 1990). Die Sensorkinase RcsC phosphoryliert RcsB, das daraufhin den Enhancer RcsA bindet. Das resultierende Heterodimer aktiviert die

ams-Transkription. Andere Proteine, wie etwa die Protease Lon greifen ebenfalls in die Regulation ein (Eastgate et al., 1995).

Neben Faktoren, die für eine Symptomausprägung notwendig sind, besitzt *E. amylovora* zusätzliche Eigenschaften, die eine erfolgreiche Besiedlung der Wirtspflanze ermöglichen (Eastgate, 2000). Das Pathogen ist *in planta* bestimmten Nährstofflimitationen ausgesetzt, wie z. B. einer geringen Eisenverfügbarkeit. *E. amylovora* produziert deshalb Eisen(III)-komplexierende Verbindung, darunter Desferrioxamin E als wichtigstes Siderophor (Expert et al., 2000). Die Fähigkeit bestimmte Zucker, wie Sorbitol und Sucrose, zu verwerten, ist ebenfalls eine Anpassung an das Überleben in der Pflanze (Aldridge et al., 1997; Bogs & Geider, 2000).

2.2 Pflanze-Pathogen-Interaktionen

Obwohl Pflanzen ununterbrochen einer Vielzahl von Schädlingen ausgesetzt sind, kommt es nur selten zu einer Besiedlung durch phytopathogene Organismen, da die attackierten Pflanzen nur suboptimale Habitate für die Pathogene darstellen. Die Mikroorganismen können zum einen oftmals die konstitutiv vorhandenen strukturellen und chemischen Barrieren der Pflanzen nicht überwinden. Zum anderen werden nach mikrobiellen Infektionen eine Reihe pflanzlicher Abwehrmechanismen induziert. Unter bestimmten Umständen, bei denen Abwehrmechanismen der Pflanzen unzureichend sind, kann die Resistenz durch das Pathogen überwunden werden und es findet anstelle einer inkompatiblen, eine kompatible Interaktion statt (Hammond-Kosack & Jones, 2000; Heath, 2000).

Die Induktion von pflanzlichen Abwehrmechanismen wird durch die Erkennung spezifischer Signalmoleküle (Elicitoren) ausgelöst, die vom Pathogen (exogene Elicitoren) stammen oder durch hydrolytische Enzyme aus den Zellwänden der Pflanze freigesetzt werden (endogene Elicitoren) (Ebel & Mithöfer, 1998). Die Signalerkennung erfolgt an spezifischen Rezeptoren der Pflanzenzelle (Bonas & van der Ackerken, 1997; Hammond-Kosack & Jones, 1997). Das Elicitor-Rezeptor-Modell stellt eine erweiterte Erklärungsmöglichkeit der „Gen-für-Gen“-Hypothese von Flor (1971) dar, wonach die Anwesenheit und die Wechselwirkung von Produkten eines pflanzlichen Resistenzgens (R-Gen) und eines komplementären, mikrobiellen Avirulenzgens (Avr-Gen) die Voraussetzung für eine inkompatible Interaktion sind (Yang et al., 1997).

Die Elicitor-Rezeptor-Bindung stellt den ersten Schritt einer Signaltransduktionskette dar, die zur Aktivierung komplexer Abwehrreaktionen führt (Yang, 1997). Unmittelbar nach der Signalperzeption werden verschiedene Ionenkanäle der Plasmamembran aktiviert (Nürnberger

et al., 1994; Zimmermann et al., 1997). Der Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes und die Depolarisierung der Plasmamembran induzieren die extrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was auch als ‚oxidative burst‘ bezeichnet wird (Wojtaszek, 1997). Hierzu gehören vor allem Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroperoxyl- und Hydroxylradikale, deren Synthese auf der Aktivität membrangebundener NADPH-Oxidasen und/oder apoplastischer Peroxidasen beruht. Es werden zwei Phasen der ROS-Bildung beobachtet, wobei die erste Phase innerhalb von Minuten erfolgt. Eine zweite, über Stunden andauernde Phase kommt jedoch nur bei der inkompatiblen Interaktion vor (Yang et al., 1997). Zusammen mit den ROS wird auch Stickstoffmonoxid als sekundärer Botenstoff bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen beschrieben (Delledonne et al., 1998). An der frühen Aktivierung der pflanzlichen Abwehr sind weiterhin Proteinkinasen und Phosphatasen beteiligt, die verschiedene Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von weiteren Proteinen katalysieren. So werden innerhalb der Phosphorylierungskaskaden Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) aktiviert, die vermutlich ihrerseits Transkriptionsfaktoren und somit die Expression von Abwehrgenen stimulieren (Ligterink et al., 1997; Eulgem et al., 1999).

Neben der Beteiligung von ROS an Signaltransduktionskaskaden wirken sie direkt toxisch auf eindringende Pathogene (Lamb & Dixon, 1997). Außerdem ist die Produktion von ROS ein charakteristisches Merkmal der Hypersensitiven Reaktion (HR), die wenige Stunden nach Pathogenkontakt zum Absterben der Zellen am Infektionsort durch die Aktivierung des programmierten Zelltodes führt (Lam et al., 2001).

Nach den frühen Reaktionen, die durch Elicitorerkennung aktiviert werden, erfolgt eine Verstärkung der Signale und eine Regulation der Expression von Abwehrgenen durch die Bildung sekundärer Signalmoleküle, wie Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Yang et al., 1997; Feys & Parker, 2000).

Am Ende dieser Signaltransduktionskaskaden steht die *de novo*-Synthese zahlreicher Proteine, die durch transkriptionelle Aktivierung der korrespondierenden Gene nach Pathogenbefall ausgelöst werden (Somssich & Hahlbrock, 1998). So akkumulieren wenige Minuten bis Stunden nach Pathogenbefall die Transkripte einer Vielzahl ‚pathogenesis related proteins‘ (PR-Proteine) und anderer ‚defense related proteins‘. Der Begriff „PR-Proteine“ umfasst intra- und extrazelluläre Proteine, die im gesunden Pflanzengewebe nicht nachweisbar sind und erst nach einer Infektion akkumulieren (Bowles, 1990). Es wurden bisher 14 PR-Protein-Familien klassifiziert, die β -1,3-Glucanasen, Chitinasen, Proteinase-Inhibitoren, Endoproteinasen und Peroxydasen sowie Proteine mit antifungalen Eigenschaften

umfassen (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Zu den ‚defense related proteins‘ gehören auch Lipoxygenasen, die an der pflanzlichen Abwehr durch die Synthese antimikrobieller Verbindungen, wie C₆-Aldehyden, und Signalmolekülen, wie Jasmonsäure, beteiligt sind (Blee, 1998).

Des weiteren werden Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels, wie z. B. die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, die Zimtsäure-4-Hydroxylase und die 4-Cumarat:CoA-Ligase, induziert. Sie sind Komponenten des Sekundärstoffwechsels und katalysieren die Synthese von Ligninvorstufen sowie die Akkumulation antimikrobieller Metabolite, die als Phytoalexine bezeichnet werden (Somssich & Hahlbrock, 1998).

Der Begriff Phytoalexin wurde 1940 von Müller & Börger geprägt. Heute werden damit niedermolekulare, antimikrobiell wirksame Verbindungen bezeichnet, die nach Pathogenkontakt in der Pflanze synthetisiert werden (Dixon, 2001). Einige Phytoalexine sind konstitutiv vorhanden und werden im Interzellularraum oder in den Vakuolen in ihrer biologisch aktiven Form bzw. als inaktive Vorstufe gespeichert (Osbourn, 1996). Nach Pathogenbefall oder Gewebeverletzung werden diese Substanzen freigesetzt bzw. aktiviert. Phytoalexine sind Sekundärmetabolite, die den Phenolen, Terpenoiden und Alkaloiden angehören (Harborne, 1999). Oft können Phytoalexine einer Pflanzenfamilie einer bestimmten Substanzklasse zugeordnet werden. So sind innerhalb der Leguminosen Isoflavonoide und innerhalb der Nachtschattengewächse Sesquiterpene weit verbreitet. In einigen anderen Pflanzenfamilien hingegen werden Verbindungen unterschiedlicher Stoffklassen produziert, wie z. B. bei Vertretern der *Gramineae*, *Compositae* oder *Moraceae*. Generell ist die Induktion von Phytoalexinen durch Pilze besser untersucht als die durch Bakterien (Grayer & Kokubun, 2001).

Speziell durch *E. amylovora* induzierte Phytoalexine bei Vertretern der *Rosaceae* wurden bisher nicht beschrieben. Aus dieser Pflanzenfamilie sind verschiedene konstitutiv gebildete phenolische Verbindungen mit antimikrobieller Wirkung bekannt (Treutter, 2000). Dazu gehören Hydroxyzimtsäure- und Benzoessäure-Derivate, Flavonole (z. B. Quercetin), Dihydrochalcone (z. B. Phloretin), Anthocyanidine, mono- und oligomerische Flavanole. Aus Apfel ist von Quercetin bzw. Phloretin bekannt, dass beide in glykosylierter Form gespeichert und unter Streßbedingungen als Aglykone freigesetzt werden. Für Phloretin ist im Gegensatz zu seinem Glykosid eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen worden (MacDonald & Bishop, 1952). Aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung von Rosengewächsen wurde die Phytoalexin-Induzierbarkeit durch pilzliche Elicitoren untersucht (Kokubun & Harborne 1995; Borejsza-Wysocki et al., 1999). Es zeigte sich, dass von 130 getesteten Arten nur von

Vertretern der Unterfamilie *Maloidae* induzierbare Verbindungen isoliert werden konnten. Es handelte sich dabei um verschiedene substituierte Biphenyle und Dibenzofurane. Im Vergleich zu anderen Pflanzenfamilien, wie der *Leguminosae*- und *Solanaceae*-Familie, konnte bisher nur bei wenigen Rosengewächsen eine Phytoalexininduktion nachgewiesen werden (Harborne, 1999).

2.3 Resistenzmechanismen in Phytopathogenen

Grundsätzlich besitzen Mikroorganismen verschiedene Strategien zum Schutz gegen toxische Substanzen, wie die Inaktivierung durch modifizierende Enzyme, die Veränderung des Wirkortes, die Verminderung des Einstromes durch Reduzierung der Anzahl von Porinen in der Zellmembran oder ein erhöhter Export durch Transportproteine (Walsh, 2000). Phytopathogene verwenden diese Mechanismen, um der zelltoxischen Wirkung von Phytoalexinen zu widerstehen (van Etten et al., 2001).

Für eine Detoxifizierung durch Enzyme gibt es insbesondere bei phytopathogenen Pilzen viele Beispiele (Morrissey und Osbourn, 1999). So inaktiviert *Nectria haematococca* (*Fusarium solani*) die Isoflavanoide Pisatin und Maackiain aus Leguminosen durch Cytochrom P450-vermittelte Demethylierung. *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* hydratisiert eine Doppelbindung der Phytoalexine Kieviton und Phaseollidin aus Buschbohne und überführt sie damit in eine inaktive Form. Eine Toleranz durch Targetveränderung ist gegenüber antifungalen Saponinen bekannt. Saponine interagieren mit Sterolen der Zellmembran und rufen Stabilitätsveränderungen hervor. Die Oomyceten *Pythium* und *Phytophthora* haben durch Verlust der Sterolsynthese eine Resistenz gegenüber Saponinen erworben. Durch den synergistischen Effekt eines reduzierten Imports und eines aktiven Exports wird eine Akkumulation toxischer Substanzen in der Zelle verhindert und so eine erhöhte Toleranz erzeugt. Der Export kann spezifisch für eine bestimmte Verbindung erfolgen oder unspezifisch ein breites Substratspektrum betreffen. Letzteres kann zu einer Multidrug-Resistenz (MDR) führen, einem Phänomen, das in den letzten Jahren durch immer häufiger auftretende, klinisch relevante Resistenzen bei humanpathogenen Bakterien an Bedeutung gewonnen hat. Transporter, die durch das Ausschleusen toxischer Verbindungen eine MDR verursachen, werden als Multidrug-Efflux-Proteine bezeichnet und sollen im folgenden näher betrachtet werden.

2.3.1 Multidrug-Efflux

Die Bedeutung von Multidrug-Efflux-Proteinen wurde insbesondere an humanpathogenen Bakterien und Pilzen sowie an Krebszellen untersucht (van Bambeke et al., 2000). Inzwischen ist bekannt, dass sie für etwa 50% des Versagens von Chemotherapien verantwortlich sind. Häufig beruht eine MDR auf einer Überexpression der Transporter durch Mutationen in der Promotor-Region oder in den Regulatorproteinen der Transportsysteme (Köhler et al., 1999). Beispielsweise wird MexAB-OprM bei bis zu 80% von β -Lactam-resistenten *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten überexprimiert (Chen et al., 1995). Eine Fluorochinolon-Resistenz bei *Escherichia coli*-Stämmen konnte auf die mutationsbedingte Überexpression des Multidrug-Efflux-Systems AcrAB-TolC zurückgeführt werden (Mazzariol et al., 2000; Wang et al., 2001).

Multidrug-Efflux-Proteine können sechs Transporter-Familien zugeordnet werden. Die ABC (ATP binding cassette)-Superfamilie gehört zu den primären Transportsystemen, die Energie aus der ATP-Hydrolyse gewinnen (Holland & Blight, 1999). Sie beinhaltet Transporter, die vorrangig bei der Resistenz eukaryotischer Zellen eine wichtige Rolle spielen. An Tumorzellen wurde erstmals die Entstehung einer MDR durch die erhöhte Expression des P-Glycoproteins beschrieben (Juliano & Ling, 1976; van Tellingen, 2001). Zusätzlich sind Vertreter der Familie der ‚multidrug resistance-associated proteins‘, wie MRP1-3, verantwortlich für eine Chemotherapeutika-Resistenz bei Tumorzellen (Leslie et al., 2001). ABC-Transporter sind nicht ausschließlich aus Säugierzellen bekannt, sondern wurden z. B. auch in *Saccharomyces cerevisiae*, einer Reihe parasitischer Protozoen und *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Ouellette et al., 2001; Rogers et al., 2001; Sanches-Fernandes et al., 2001). Bei Bakterien wurden LmrA aus *Lactococcus lactis* und vier weitere MDR vermittelnde ABC-Transporter aus *Enterococcus faecalis* charakterisiert (Davis et al., 2001; van Veen et al., 2000).

In Bakterien spielen sekundäre Transporter, die den Protonengradienten der Membran als Energiequelle für die Translokation verwenden, eine wichtigere Rolle für den Multidrug-Efflux. Die bei Pro- und Eukaryoten vorkommende ‚major facilitator‘ (MF)-Superfamilie stellt die größte Familie von Multidrug-Efflux Pumpen dar (Pau et al., 1998; Saier et al., 1999). Diese Proteine besitzen entweder 12 oder 14 transmembranale Domänen. Insbesondere aus *Staphylococcus aureus* wurden QacA, QacB und NorA genauer charakterisiert (Brown & Skurray, 2001; Saier et al., 1999). Die Transporter der MF-Superfamilie in der inneren Membran Gram-negativer Bakterien wirken oft zusammen mit periplasmatischen Proteinen der ‚membrane fusion protein‘ (MFP)-Familie sowie einem ‚outer membrane factor‘ (OMF)

und ermöglichen so einen Substrat-Export durch beide Membranen. Ein Beispiel hierfür stellt das System EmrAB-TolC aus *E. coli* dar (Lomovskaya & Lewis, 1992; Zgurskaya & Nikaido, 2000). MFP's sind am N-Terminus durch einen Lipid-Rest in der inneren Membran verankert, durchspannen das Periplasma und interagieren mittels eines konservierten C-terminalen Bereiches mit der äußeren Membran (Dinh et al., 1994). OMFs sind für eine Translokation durch die äußere Membran zuständig (Paulsen et al., 1997). Basierend auf Ergebnissen der Kristallstruktur von TolC aus *E. coli* und von Mutationsanalysen an OprM aus *Pseudomonas aeruginosa*, wirken OMFs als Trimere und besitzen eine transmembranale und eine weit ins Periplasma ragende hydropile Domäne (Koronakis et al., 2000; Li & Poole, 2001; Wong et al., 2001). MFPs und OMFs können auch mit ABC-Transportern und Vertretern der 'resistance-nodulation-cell division' (RND)-Superfamilie interagieren.

Vertreter der RND-Familie sind hauptsächlich in Gram-negativen Bakterien für eine MDR von Bedeutung (Tseng et al., 1999). Diese Proteine besitzen typischerweise 12 membranspannende α -Helices und 2 hydrophile periplasmatische Domänen zwischen α -Helix 1 und 2 sowie zwischen α -Helix 7 und 8. Der Substrattransport erfolgt durch einen Protonen-Antiportmechanismus. Die meist konstitutiv exprimierten RND-Multidrug-Pumpen besitzen ein sehr breites Substratspektrum, wobei die für organische Lösungsmittel spezifischen Pumpen von *Pseudomonas putida* eine Ausnahme bilden (Ramos et al., 1998). Sehr gut charakterisiert ist AcrB aus der inneren Membran von *E. coli*, das spezifisch mit dem MFP AcrA interagiert (Nikaido & Zgurskaya, 2001). Als dritte Komponente für einen Export durch beide Membranen wird das Porin-ähnliche Protein der äußeren Membran, TolC, rekrutiert (Sharff et al., 2001). AcrAB besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu MexAB-OprM, dem wichtigsten Multidrug-Efflux-Transporter aus *P. aeruginosa*, sowie anderen Transportsystemen aus *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Enterobacter aerogenes* (Poole, 2001; Pradel & Pages, 2002; Sanches et al., 1997; Schafer et al., 2001). Wie die breite Substratspezifität der Multidrug-Efflux-Proteine zustande kommt und wie der Transport erfolgt, konnte bisher nur unzureichend geklärt werden. Die Auflösung der Kristallstruktur von AcrB soll genauere Aussagen über die Funktionsweisen von Multidrug-Efflux-Transportern der RND-Familie liefern (Murakami et al., 2002). Transporter der RND-Familie sind ebenfalls in Gram-positiven Bakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten identifiziert worden, wobei deren Funktion größtenteils noch unbekannt ist.

Multidrug-Efflux-Proteine sind aus drei weiteren Transporter-Familien bekannt. Proteine der 'small multidrug resistance' (SMR)-Familie sind mit einer Länge von etwa 100 Aminosäure-Resten die kleinsten Multidrug-Efflux Pumpen, die verschiedene Verbindungen

im Protonenaustausch transportieren (Putman et al., 2000). Am besten charakterisiert sind EmrE aus *E. coli* und Smr aus *S. aureus* (Schuldiner et al., 2001). Untersuchungen an EmrE haben gezeigt, dass dieser Transporter als Homooligomer funktioniert. Bisher sind SMR-Proteine ausschließlich aus Bakterien bekannt.

Basierend auf Sequenzanalysen begründeten Brown et al. (1999) die ‚multi antimicrobial extrusion‘ (MATE)-Familie, die sekundäre Transporter aus Eukaryoten, Archaeobakterien und Eubakterien beinhaltet. Es handelt sich hierbei um Proteine mit 12 membranspannenden Domänen. Nur wenige Mitglieder dieser Familie sind funktionell charakterisiert, darunter NorM aus *Vibrio parahaemolyticus* und *E. coli* (Morita et al., 1998). Für NorM aus *V. parahaemolyticus* konnte der Transport seiner Substrate durch einen Na⁺-Antiport nachgewiesen werden (Morita et al., 2000).

Proteine der ‚multidrug endosomal transporter‘ (MET)-Familie sind bisher nur in Säugerzellen identifiziert worden und besitzen 4 transmembranale Domänen. Der einzige charakterisierte Vertreter ist der Transporter MTP aus der Maus (Hogue et al., 1999).

Durch die Sequenzierung der Genome verschiedener Organismen konnte die phylogenetische Verbreitung von Multidrug-Efflux-Systemen untersucht werden (Paulsen et al., 2000; 2001). Es ergab sich, dass diese Transporter ubiquitär vorhanden sind und dass selbst Organismen mit kleinen Genomen, wie Mycobakterien, mindestens einen Multidrug-Efflux-Transporter besitzen. Generell sind etwa 10% aller Transportsysteme für den Multidrug-Efflux verantwortlich (Abb. 3). In einem Organismus können mehrere Transporter aus unterschiedlichen Familien vorkommen. Paulsen et al. (2001) fanden eine große Variabilität von Transporter-Typen innerhalb der untersuchten Mikroorganismen. Dies stellt wahrscheinlich eine Anpassung an unterschiedliche ökologische Nischen und Biosyntheseleistungen dar. Generell sind häufig Transporter der MF- und ABC-Familie in den Multidrug-Efflux involviert, wobei aber z. B. Archaeobakterien vorrangig MF-Typ jedoch keine ABC-Transporter besitzen. Die RND-Typ Transporter sind hauptsächlich innerhalb der γ - und β -Proteobakterien zu finden. Vertreter der MATE-Familie sind weit verbreitet, wohingegen Proteine der SMR-Familie selten auftreten.

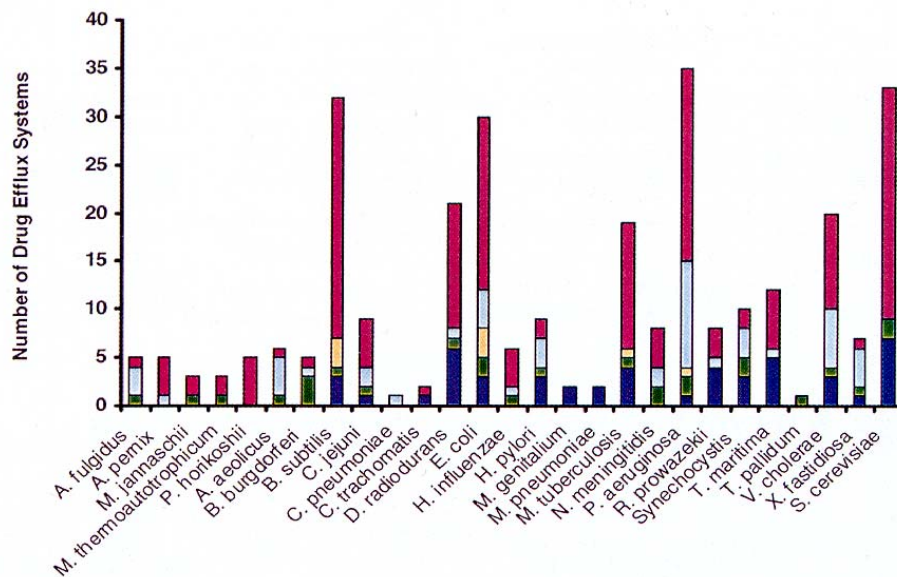


Abb. 3. Anzahl vorhergesagter Multidrug-Efflux-Transporter in Mikroorganismen mit bekannter Genomsequenz. Die Farben geben die Zugehörigkeit zu verschiedenen Transporter-Familien an: dunkelblau, ABC-; rot, MF-; hellblau; RND-, grün, MATE-, gelb, SMR-Familie (Paulsen et al., 2001).

Bei phytopathogenen Mikroorganismen wurden Multidrug-Efflux-Proteine identifiziert, die pflanzliche Abwehrstoffe und Antibiotika transportieren und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese und der Resistenz spielen. Insbesondere bei Pilzen wurden Vertreter der ABC-Transporterfamilie charakterisiert (Del Sorbo et al., 2000). In dem Pilz *Magnaporthe grisea* wurde das Transportergen *ABC1* identifiziert, dessen Expression durch Fungizide und das Phytoalexin Sakuranetin aus Reis erhöht ist (Urban et al., 1999). Ein Substrat konnte für ABC1 bisher jedoch nicht identifiziert werden. In *Aspergillus nidulans* wird die Transkription des Transporter-Gens *atrB* durch das aus Wein bekannte Phytoalexin Resveratrol induziert (Del Sorbo et al., 1997). Des weiteren wird durch AtrB eine Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum an Fungiziden vermittelt (Andrade et al., 2000). Schoonbeek et al. (2001) zeigten, dass BcatrB in *Botrytis cinerea* eine Resistenz gegenüber Resveratrol und dem Fungizid Fenpiclonil vermittelt. Zusätzlich sind *BcatrB*-Mutanten in ihrer Virulenz an Weinpflanzen eingeschränkt. Der aus *Gibberella pulicaris* bekannte ABC-Transporter Gpabc1 ist notwendig für eine Toleranz gegenüber dem Phytoalexin Rhisitin aus Kartoffel und für die Virulenz an Kartoffelknollen (Fleißner et al., 2002). Für PMR1 und PMR5 aus *Penicillium digitatum* sind eine Reihe Substrate, wie Fungizide und Resveratrol bekannt (Nakaune et al., 2002).

Trotz der weiten Verbreitung von Multidrug-Efflux-Proteinen in Prokaryoten wurden in phytopathogenen Bakterien bisher nur wenige untersucht. In dem Gram-negativen Bakterium *Agrobacterium tumefaciens*, das Wurzelhalsgallen an Dikotyledonen verursacht, wurden zwei

Transporter der RND-Familie identifiziert. Palumbo et al. (1998) verwendeten den *A. tumefaciens* Stamm 1D1609, um Resistenzen gegen die von *Medicago sativa* produzierten antimikrobiellen Isoflavonoide aufzufinden. Dabei wurden die Gene *ifeABR* identifiziert, die für ein Transportsystem und einen Repressor kodieren. Die Expression von *ifeA* wird durch verschiedene Isoflavonoide, wie das in Wurzelexudaten von Klee vorkommende Coumestrol, Formononetin oder Medicago induziert. Für Coumestrol wurde eine Akkumulation in einer *ifeA*-Mutante gezeigt. Zusätzlich spielt IfeAB bei der Wurzelbesiedlung eine Rolle. Die IfeA-Mutante konnte zwar die Kleewurzeln allein normal besiedeln, war aber in dieser Fähigkeit in einem Wettbewerbsversuch mit dem Wildtyp signifikant eingeschränkt. Aus einem anderen *A. tumefaciens* Stamm klonierten Peng und Nester (2001) vier Gene, die mit *ameA*, *ameB*, *ameC* und *ameR* bezeichnet wurden. Die Gene *ameAB* kodieren für ein periplasmatisches bzw. innermembranales Protein, *ameC* für einen Vertreter der ‚outer membrane factor‘-Familie und *ameR* für einen Repressor. Nur die Mutation des *ameC*-Gens resultierte in einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika, wie Novobiocin und Carbenicillin sowie einigen Detergenzien. Ob dieses Transportsystem eine Rolle bei der Pathogenese spielt, wurde bislang nicht untersucht.

In *Rhizobium etli* wurden von Gonzales-Passayo und Martinez-Romero (2000) die Gene *rmrA* und *rmrB* identifiziert, die für einen Vertreter der ‚membrane fusion protein‘-Familie sowie der MF-Transporterfamilie kodieren. Das stickstofffixierende Bakterium wurde aus Wurzelknöllchen von Bohnenpflanzen isoliert. Während der Interaktion mit der Wirtspflanze müssen Rhizobien hohe Konzentrationen an freigesetzten bakteriziden Phytoalexinen tolerieren können. RmrA- und RmrB-Mutanten waren signifikant sensibler gegenüber Phaseollin, Phaseollidin, Naringenin und Salicylsäure. Des Weiteren bildeten RmrA-Mutanten im Durchschnitt 40% weniger Knöllchen im Vergleich zum Wildtyp (Gonzales-Passayo und Martinez-Romero, 2000). Aus *Bradyrhizobium japonicum*, dem stickstofffixierenden Symbionten der Sojabohne, ist das Operon *ragABrpoH₃ragCD* bekannt. Die ersten beiden Gene, *ragAB*, kodieren für ein Zwei-Komponentensystem, *rpoH₃* für einen alternativen Sigmafaktor und *ragCD* für einen Transporter der RND- bzw. MFP-Familie (Krummenacher & Narberhaus, 2000). RagC besitzt signifikante Sequenzähnlichkeit zu Multidrug-Efflux-Transportern, wie AcrB und MexB. Allerdings konnten für verschiedene Rag-Mutanten keine Phänotypen festgestellt werden, so dass die Funktion bisher unbekannt blieb.

In den letzten 10 Jahren wurden von Pflanzen produzierte antimikrobielle Peptide intensiv untersucht (Garcia-Olmedo et al., 1998). Sie wurden in 10 verschiedene Familien klassifiziert. Analog zu den Phytoalexinen sind sie als konstitutiver oder induzierbarer

Resistenzmechanismus in die pflanzliche Abwehr involviert (Garcia-Olmedo et al., 2001). Bei *Pectobacterium chrysanthemi*, dem Erreger der Weichfäule an verschiedenen Pflanzen, wurde von Lopez-Solanilla et al. (1998) das fünf Gene umfassende *sap*-Operon identifiziert, dass für ein ABC-Transportsystem kodiert. Eine *sapA*-Mutante war sensitiver gegenüber α -Thionin aus Weizen und Snakin-1 aus Kartoffelknollen. Außerdem besaß die Mutante eine signifikant reduzierte Virulenz an Kartoffelknollen und Chicoree-Blättern im Vergleich zum Wildtyp (Lopez-Solanilla et al., 2001). Ähnliche Gene des *sap*-Operons wurden auch in *Salmonella typhimurium* charakterisiert und entsprechende Mutanten zeigten eine eingeschränkte Virulenz an Mäusen. Bei dem Sap-Transportmechanismus handelt es sich um einen Virulenzfaktor, der sowohl bei Human- als auch bei Phytopathogenen von Bedeutung ist. Außer bei *P. chrysanthemi* wurden *sap*-Gene in sechs weiteren verwandten Arten, darunter *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pantoea stewartii*, *Brenneria nigrifluens* und *Erwinia rhapontici* gefunden. *E. amylovora* zählt ebenfalls zu dieser phylogenetischen Verwandtschaft, wurde jedoch nicht in die Untersuchung einbezogen.

2.3.2 Resistenzmechanismen in *E. amylovora*

Resistenzmechanismen von *E. amylovora* gegenüber Phytoalexinen sind bisher weitgehend unbekannt. Dagegen wurde die inzwischen weltweit verbreitete Resistenz gegen Streptomycin, die durch den Einsatz dieses Antibiotikums zur Kontrolle des Feuerbrandpathogens im Obstbau entstand, genauer untersucht (Jones & Schnabel, 2000). Sie wurde erstmals zu Beginn der 70er Jahre in den USA beobachtet und wird durch zwei Mechanismen verursacht (Miller & Schroth, 1972). Zum einen ist das ribosomale Protein S12 durch Mutation in seinem kodierenden Gen *rpsL* so verändert, dass das Antibiotikum nicht mehr an das Ribosom binden kann (Chiou & Jones, 1995a). Zum anderen kann eine Resistenz durch Aminoglycosid-modifizierende Enzyme erworben werden. Die Gene *strA* und *strB* kodieren für Phosphotransferasen, die Streptomycin durch Phosphorylierung einer Hydroxyl-Gruppe inaktivieren (Chiou & Jones, 1995b). Beide Gene sind in dem Transposon Tn5393 lokalisiert, das sich wiederum auf dem konjugativen Plasmid pEa34 befindet, so dass diese Resistenzgene in andere Zellen transferiert werden können (Chiou & Jones, 1993). Palmer et al. (1997) identifizierten in *E. amylovora* ein zweites Plasmid, pEa8.7, das ebenfalls die Gene *strA* und *strB* besitzt und das mit dem Plasmid RSF1010 aus humanpathogenen Gram-negativen Bakterien verwandt ist. Die Resistenzgene können auch an andere pflanzenassoziierte Gram-negative Bakterien, wie *Pantoea agglomerans* und *Pseudomonas*-

Arten, weitergegeben werden, was die Entstehung eines Resistenz-Reservoirs und damit die *strA/B*-Verbreitung fördert (Burr et al., 1993; Sobiczevski et al., 1991).

Obwohl Streptomycin das wirkungsvollste Agents zur Kontrolle von Feuerbrand darstellt, ist sein Einsatz aufgrund der Resistenzentwicklung nicht nur bei *E. amylovora* sondern möglicherweise auch bei Tier- und Humanpathogenen, in den meisten Ländern verboten (Psallidas & Tsiantos, 2000). Ein anderes Antibiotikum, das zur Bekämpfung eingesetzt wird, ist Oxytetracyclin. Ferner dienen Kupferverbindungen zur Kontrolle der Krankheit. Es werden auch Substanzen eingesetzt, die selbst nicht antimikrobiell wirksam sind, sondern in den pflanzlichen Metabolismus eingreifen und Abwehrmechanismen induzieren, wie z. B. 1,2,3-Benzothiadiazol-7-carbothiosäure-S-methylester (BionTM), Harpin (MessengerTM) und Prohexadion-Ca (ApogeeTM).

Eine Alternative bietet die biologische Kontrolle von Feuerbrand (Johnson & Stockwell, 2000). Sie beruht generell auf antagonistischen Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen. Dabei konkurrieren die Organismen um Nahrungs- und Raumressourcen oder produzieren antimikrobielle Substanzen, um Vorteile bei der Besiedlung eines Lebensraumes zu erlangen. Die Infektion einer Pflanze kann verhindert werden, wenn das Pathogen durch diese antagonistischen Mechanismen verdrängt bzw. in seiner Vermehrung eingeschränkt wird.

Für *E. amylovora* wurde bereits beschrieben, dass die Primärinfektion im Frühjahr durch die Blüte erfolgt (Wilson et al., 1989a; 1989b). Auf der Narbenoberfläche des Pistils kann das Pathogen hohe epiphytische Populationsdichten erreichen, was eine wichtige Voraussetzung für die Infektion und weitere Verbreitung darstellt (Thomson, 1986). Da auf anderen Pflanzenteilen solche Populationsdichten nicht etabliert werden können, wird die Blüte als der wesentliche Wirkort der biologischen Kontrolle angesehen (Johnson & Stockwell, 2000).

Kommerziell werden die beiden Gram-negativen Bakterienstämme *Pantoea agglomerans* C9-1 und *Pseudomonas fluorescens* A506 bei Apfel und Birne als Antagonisten des Feuerbrandes eingesetzt. Beide sind an eine epiphytische Lebensweise angepasst und können, durch die Etablierung einer hohen Zellzahl auf der Narbenoberfläche eine nachfolgende Kolonisation durch *E. amylovora* verhindern. Bei *P. fluorescens* A506 beruht der Antagonismus wahrscheinlich auf einer Raum- und Nahrungskonkurrenz (Wilson & Lindow, 1993). Eine Synthese antimikrobieller Substanzen konnte im Gegensatz zu *P. agglomerans* C9-1 nicht nachgewiesen werden. Letzterer Stamm produziert die antibakteriellen Antibiotika Herbicolin I und O, bei denen es sich vermutlich um Peptide handelt (Ishimaru et al., 1988; <http://www.colostate.edu/Depts/AES/projs/635.htm>).

Insbesondere *P. agglomerans*-Stämme wurden als potentielle Antagonisten zur Kontrolle des Feuerbrandpathogens untersucht. Einerseits konnte gezeigt werden, dass *P. agglomerans* denselben Lebensraum besiedelt wie *E. amylovora* (Hattingh et al., 1986). Andererseits zeichnen sich Stämme dieser Art durch die Produktion verschiedener Antibiotika aus, wie z. B. *P. agglomerans* A111 (Winkelmann et al., 1980), Eh318 (Wright et al., 2001), Eh1087 (Kearns & Mahanty, 1998) und Eh252 (Vanneste et al., 1992). Die antimikrobiellen Substanzen der letzten beiden Stämme sind bisher nur wenig charakterisiert, wobei Eh1087 wahrscheinlich ein β -Lactam-Antibiotikum produziert. Der Stamm A111 synthetisiert zwei fungizide Lipopeptide, Herbicolin A und B. Am besten untersucht sind die Peptidantibiotika Pantocin A und B aus *P. agglomerans* Eh318. Für beide konnte eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden (Wright et al., 2001).

2.4 Zielsetzung

E. amylovora ist in seiner natürlichen Umgebung einer Vielzahl toxischer Substanzen ausgesetzt. Während des epiphytischen Wachstums muss es nicht nur mit anderen Mikroorganismen um Lebensraum und Nahrung konkurrieren, sondern auch Antibiotika, die einige dieser Organismen produzieren, tolerieren. Nach der Infektion seines Wirtes muss es an die toxische Wirkung von Phytoalexinen angepasst sein, um in der Pflanze überleben zu können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Rolle von Multidrug-Efflux-Proteinen bei der Pathogenese des Feuerbrandes zu untersuchen. Während eines dieser Arbeit vorausgegangenen Screenings nach einer temperaturabhängigen Genexpression in *E. amylovora* GSPB 1189 wurde ein Gen identifiziert, das für einen Multidrug-Efflux-Transporter kodiert (Goyer & Ullrich, 1999). Dieses Gen sollte zunächst molekularbiologisch analysiert werden. Da zu vermuten war, dass *E. amylovora* weitere Multidrug-Efflux-Proteine besitzt, wurde ein zweiter Transporter in die Untersuchungen einbezogen. Es wurde ein AcrAB-ähnliches Transportsystem ausgewählt, von dem bereits bekannt war, dass es in *Escherichia coli* eine wichtige Rolle bei dem Multidrug-Efflux spielt (Nishio & Yamaguchi, 2001; Sulavik, et al., 2001). Es sollten die Gene dieses AcrAB-ähnlichen Transporters in *E. amylovora* identifiziert und kloniert werden. Anschließend fand eine funktionelle Charakterisierung beider Transporter statt. Dafür wurde zunächst für beide Transporter ein Substratspektrum ermittelt. Um den Einfluss der Transporter auf die Virulenz des Feuerbrandpathogens zu untersuchen, sollten zunächst Transporter-Mutanten mittels Marker-Austausch-Mutagenese erzeugt werden. Diese Mutanten wurden im Virulenztest an Apfel eingesetzt und die Überlebensrate sowie die Krankheitsausprägung im Vergleich zum

Wildtyp ermittelt. Des weiteren sollte der Einfluss der Transporter auf die Interaktion mit anderen Mikroorganismen aus der Blüte, dem primären Infektionsort einer Pflanze durch *E. amylovora* untersucht werden. Dafür wurden zunächst epiphytisch lebende Mikroorganismen von Blüten der Wirtspflanzen des Feuerbrandpathogens isoliert. Im Anschluss wurde eine mögliche antimikrobielle Wirkung dieser Isolate auf die Mutanten und den Wildtyp untersucht. Isolate mit einer unterschiedlichen Wachstumshemmung von Mutanten und Wildtyp wurden taxonomisch zugeordnet und deren antimikrobielle Substanz soweit möglich charakterisiert.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Bakterienstämme

3.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 1. Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Charakteristika	Literatur
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Sambrook & Russel, 2001
<i>E. coli</i> TG1	<i>subE</i> <i>hsd</i> Δ 5 <i>thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F'[<i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lacF</i> ^l <i>lacZ</i> Δ M15]	Sambrook & Russel, 2001
<i>E. coli</i> KAM3	AcrAB-Mutante von TG1	Morita et al., 1998
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi pro hsdR</i> ⁻ <i>hsdM</i> ⁺ <i>recA</i> RP4 2 ⁻ Tc::MU-Km::Tn7(Tet ^R /Sm ^R)	Wilson et al., 1995
<i>E. coli</i> S17-1 λ - <i>pir</i>	lysogener Lambda-Phage mit <i>pir</i> (S17-1-Derivat)	Wilson et al., 1995

3.1.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Zellen wurden mit LB-Medium bei 37°C unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika (Tab. 2) angezogen. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte bei 250 rpm.

Tab. 2. Verwendete Antibiotika-Konzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung ¹	Endkonzentration im Medium
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml	50 μ g/ml
Chloramphenicol (Cm)	25 mg/ml	25 μ g/ml
Kanamycin (Km)	25 mg/ml	25 μ g/ml
Norfloxacin (Nor)	100 μ g/ml	0,05 μ g/ml
Spectinomycin (Spec)	25 mg/ml	25 μ g/ml
Streptomycin (Sm)	25 mg/ml	25 μ g/ml
Tetracyclin (Tet)	25 mg/ml	25 μ g/ml

¹Lösungsmittel für Cm, Tet = 70% Ethanol, Nor = 0,1 M NaOH

LB (Luria-Bertani; 1 Liter):

10 g Bactotrypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl; pH7,5
15 g Agar

3.1.3 *E. amylovora*- und andere pflanzenassoziierte Bakterien-Stämme

Tab. 3. Verwendete *E. amylovora*- und andere pflanzenassoziierte Bakterien-Stämme

Stamm	Charakteristika/Wirtspflanze	Herkunft
<i>E. amylovora</i> GSPB 1189	Wildtyp; Birne	K. Rudolph
MEA60, 63, 100, 163, 212, 246	Sm ^R Sp ^R , Transposon (miniTn5- <i>gusA</i>)-Mutanten von GSPB 1189 mit temperaturregulierter GUS-Expression	C. Goyer
MEA107	Sm ^R Sp ^R , Transposon-Mutante von GSPB 1189 mit Insertion des miniTn5- <i>gusA</i> in <i>fliD</i> -ähnlichem Gen	C. Goyer
MEA225	Sm ^R Sp ^R , Transposon-Mutante von GSPB 1189 mit Insertion des miniTn5- <i>gusA</i> in <i>norM</i>	C. Goyer
34	Cm ^R , <i>norM</i> -Mutante von GSPB 1189, trägt Cm-Resistenzkassette in <i>norM</i>	diese Arbeit
5	Km ^R , <i>acrB</i> -Mutante von GSPB 1189, trägt Km-Resistenzkassette in <i>acrB</i>	diese Arbeit
GSPB 1190, 1263		K. Rudolph
GSPB 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659	Birne	K. Rudolph
GSPB 1839	Quitte	K. Rudolph
Ea 1/79		K. Geider
Ea 8, Ea 11, Ea 0, Ea 1, Ea 266		K. Geider
IL6	Rubus	K. Geider
PD 576, 579	produzieren wenig Levan	K. Geider
<i>E. pyrifoliae</i> Ep1/96	Nashi-Birne	K. Geider
<i>E. rhapontici</i> GSPB 454		K. Rudolph
<i>E. rhapontici</i> DSM 4484		F. Boernke
<i>E. persicinus</i> CFBP 3622		K. Geider
<i>E. persicinus</i> GSPB 2443		K. Rudolph
<i>E. mallotivora</i> CFBP 2503	Eiche	K. Geider
<i>E. psidii</i> CFBP 3627	Guave	K. Geider
<i>E. tracheiphila</i> CFBP 2355	Gurke	K. Geider
<i>E. herbicola</i> pv. <i>gypsophilae</i> 824-1		I. Barash
<i>Pantoea agglomerans</i> Bel2/7	Apfel	diese Arbeit
<i>P. agglomerans</i> Bel3/1	Zierapfel	diese Arbeit
<i>P. agglomerans</i> MR4/1	Apfel	diese Arbeit
<i>P. agglomerans</i> MR5/1	Apfel	diese Arbeit
<i>P. agglomerans</i> QT2/5	Quitte	diese Arbeit
<i>P. agglomerans</i> 2b/89	Sojabohne	B. Völksch

<i>P. agglomerans</i> 15b/89	Sojabohne	B. Völksch
<i>P. agglomerans</i> 62b/90	Sojabohne	B. Völksch
<i>P. stewartii</i> SW 2	Getreide	D. L. Coplin
<i>P. stewartii</i> SS 104	Getreide	D. L. Coplin
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> AC 4150	Getreide	A. Collmer
<i>P. chrysanthemi</i> 3937	Getreide	A. Collmer
<i>P. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> 90	Zuckerrübe	B. Völksch
<i>Brenneria quercina</i> CFBP 3617	Eiche	K. Geider
<i>B. salicis</i> CFBP 802	Weide	K. Geider
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Bel1/2	Apfel	diese Arbeit

3.1.4 Kultivierung von *E. amylovora*- und anderen pflanzenassoziierten Bakterien-Stämmen

Die Kultivierung der oben aufgelisteten Stämme erfolgte auf den Komplexmedien LB, King's B und auf dem Minimalmedium AMM2 bei 18°C oder 28°C. Diese Medien wurden ebenfalls für Flüssigkulturen verwendet, die bei 280 rpm inkubiert wurden.

King's B-Medium (1 Liter):

20 g Pepton
1,5 g K_2HPO_4
1,5 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$
10 ml Glycerol, pH 7,2
15 g Agar

AMM2 (Asparagin-Minimalmedium, 1Liter):

4 g L-Asparagin
12,8 g $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$
3 g K_2HPO_4
3 g NaCl
0,2 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$
0,25 g Nicotinsäure
15 g Agar

nach Autoklavieren:

25 ml Fructose (40% (w/v), filtersterilisiert)
1 ml Thiamin (200 mg/ml, filtersterilisiert)

3.1.5 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Bakterien erfolgte bei 4°C bis 2 Monate auf Boullion-Glycerin-Agar. Für die Langzeiterhaltung wurden die Stämme in 15% Glycerin (v/v) bei -80°C gelagert. Zur Herstellung der Konserve wurden die in Flüssigmedium oder auf Agarplatte kultivierten Bakterien in der Glycerinlösung aufgenommen.

Boullion-Glycerin-Agar (1Liter):

20 g Glycerin
1 g Hefeextrakt
5 g Pepton
3 g Fleischextrakt
15 g Agar

3.2 Enzymaktivitätsbestimmung

3.2.1 Qualitativer β -Glucuronidase-Nachweis

Untersuchungen zur Genexpression bei *E. amylovora* wurden mit Hilfe des für die β -Glucuronidase (GUS) kodierenden Reportergens *gusA* durchgeführt (Jefferson et al., 1986).

Der GUS-Nachweis auf 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid (X-Gluc)-Platten diente der qualitativen Bestimmung der Enzymaktivität bei 18°C und 28°C. Dabei wird das Substrat X-Gluc in D-Glucuronsäure und 5-Brom-4-indoxyl hydrolytisch gespalten. 5-Brom-4-indoxyl dimerisiert zu der blauen unlöslichen Verbindung 5,5'-Dibrom-4,4'-chlorindigo.

Für den Assay wurden Bakterienzellen von LB-Platten in 500 μ l H₂O_{demin} resuspendiert und 3 μ l der Suspension auf X-Gluc-MM2-Platten getropft. Die Platten wurden bei 18°C und 28°C 48 h inkubiert und anschließend die Stärke der Blaufärbung visuell verglichen. Für eine optimale Auswertung wurde dem Medium statt Agar Gelerit (Roth, Karlsruhe) zugesetzt, das aufgrund des klaren Mediums eine bessere Beurteilung der Farbintensität erlaubte.

X-Gluc-MM2-Medium (1 Liter) :

4 g L-Asparagin	
3 g K ₂ HPO ₄	
3 g NaCl	nach Autoklavieren:
0,2 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O	25 ml Fructose (40% (w/v), filtersterilisiert)
0,25 g Nicotinsäure	1 ml Thiamin (200 mg/ml, filtersterilisiert)
8 g Gelerit (Roth, Karlsruhe)	1 ml X-Gluc (20 mg/ml 1:1 H ₂ O/Methanol)

3.2.2 Quantitativer β -Glucuronidase-Nachweis

Für die quantitative Bestimmung der GUS-Aktivität wird 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid enzymatisch in D-Glucuronsäure und das fluorometrisch nachweisbare 7-Hydroxy-4-methylcoumarin (MU) gespalten.

Die Gewinnung des Zellmaterials erfolgte aus Flüssigkulturen, die in AMM2-Medium (3.1.5.) bei 18°C und 28°C hergestellt wurden. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 3 wurden 1,5 ml Kulturlösung 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 500 μ l Extraktions-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 3 x 15 s Ultraschallbehandlung mit 72% Intensität auf Eis.

Alle anschließenden Assay-Schritte wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei folgende Plattenbelegung verwendet wurde:

C1-12 bis H1-12	180 µl Stop-Puffer
B1-11	180 µl Assay-Puffer
B12	180 µl Stop-Puffer
A11	200 µl H ₂ O _{demin.}
A12	200 µl MU-Standard-Lösung
A1-10	100 µl Zelllysate

Die Platten wurden auf Eis vorbereitet. Zum Starten der Reaktion wurden aus Reihe A je 20 µl in Reihe B pipettiert. Für den Wert $t = 0$ wurden unmittelbar je 20 µl aus Reihe B in den Stop-Puffer der Reihe C überführt und anschließend je 20 µl aus Reihe C in Reihe D überführt. Danach wurde die Mikrotiterplatte 10 min in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 10 min Inkubation wurde die Reaktion gestoppt, indem je 20 µl aus Reihe B in Reihe E pipettiert wurden (1:100 Verdünnung). Es wurden nachfolgend je 20 µl aus Reihe E seriell 1:10 bis in Reihe H verdünnt. Das durch die GUS-Aktivität gebildete MU wurde mit dem Fluorometer Fluorolite 1000 (Dynatech Laboratories, Denkendorf) bei einer Exitation von 390 nm und einer Emission von 450 nm sowie bei einer Lampenspannung von 3,3 V vermessen. Die Aktivität der β -Glucuronidase wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta E_{450}(\text{Probe}) = \Delta E_{450}(t_{10}) - \Delta E_{450}(t_0)$$

$$\text{GUS-Aktivität}(U) = \Delta E_{450}(\text{Probe}) \times 5 \times 100 / (\Delta E_{450} (100 \mu\text{M MU-Standard}))$$

$$\text{spezifische Aktivität (U/ mg)} = 2 \times U \text{ GUS/ mg Protein}$$

Extraktions-Puffer (100 ml):

10 ml 0,5 M Na₂HPO₄ pH7
 2 ml 0,5 M EDTA pH8
 2 ml 5% Laurylsarcosin
 1 ml 10% TritonX-100
 70 µl β -Mercaptoethanol
 85 ml H₂O_{demin.}

Assay-Puffer (5 ml für 2 Mikrotiterplatten):

4 mg 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
 5 ml Extraktions-Puffer

Stop-Puffer:

0,2 M Na₂CO₃

MU-Standard:

1 mM 7-Hydroxy-4-methylcoumarin

3.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Der Nachweis beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblau G250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine.

200 µl Zelllysat in Assay-Puffer wurde mit 200 µl 10% Trichloressigsäure versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 400 µl 1 M NaOH resuspendiert. Die Proteinbestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. In die Reihen B bis H wurden 100 µl H₂O_{demin.}, in A1-10 wurden 20 µl der Proteinproben und 130 µl H₂O_{demin.} gegeben. In A11 wurden 150 µl H₂O_{demin.} für die Negativkontrolle und in A12 20 µl Standard-Proteinlösung und 130 µl H₂O_{demin.} zur Erstellung einer Eichgraden pipettiert. Indem je 50 µl aus Reihe A in Reihe B bis H überführt wurden, erfolgte eine serielle 1:3-Verdünnung der Proteinproben. In alle Kavitäten wurde 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion der Lösungen bei 600 nm gegen H₂O_{demin.} und Bradford-Reagenz (Spalte 11) als Negativkontrolle mit dem MRX Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Denkendorf) gemessen.

Bradford-Reagenz:

10% (v/v) 85% o-Phosphorsäure
5% (v/v) 95% Ethanol
0,01% (w/v) Coomassie Brilliantblau G250

Protein-Standard:

2 mg/ml γ-Globulin

3.3 Isolation von Nukleinsäuren

3.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

3.3.1.1 Alkalische Lyse

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* beruht bei dieser Methode auf einem Zellaufschluss durch alkalische SDS-Lyse. Genügte eine niedrige Plasmidmenge, wurden 1,5 ml einer Übernacht-Flüssigkultur 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 150 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von 150 µl P2-Puffer und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur. Mit 150 µl eiskaltem P3-Puffer wurde das Lysat neutralisiert und 10 min auf Eis gehalten. Die dabei zusammen mit dem entstandenen SDS-K⁺-Ionen-Komplex präzipitierten Zellwandbruchstücke, denaturierte chromosomale DNA und Proteine konnten durch anschließende zehnminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt werden. Die Plasmide renaturierten im neutralen Milieu, verblieben im Überstand und wurden durch Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 0,7 Volumen 2-Propanol präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und anschließendem Waschen des DNA-Pellets mit 70% Ethanol, wurde die getrocknete Plasmid-DNA in H₂O_{demin.} resuspendiert.

Um reine Plasmid-DNA zu erzielen, wurde der oben gewonnene Überstand über Anionenaustauschersäulen (Qiagen Plasmid Mini-, Midi- und Maxi-Kit (Qiagen, Hilden)) oder eine Silica-Membran (NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren), aufgereinigt. Die Reinigung wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

P1-Puffer (Resuspensionspuffer):

50 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

P2-Puffer (Lysepuffer):

200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

P3-Puffer**(Neutralisationspuffer):**

3 M Kaliumacetat pH 5,5

3.3.1.2 ,Boiling lysis'

Die Zellyse erfolgt bei dieser Methode durch Detergenz- und Lysozymeinwirkung und anschließendem Erhitzen (Holmes & Quigley, 1981). Zur Plasmidisolation wurden Bakterienzellen in STET resuspendiert, nach Lysozym-Zugabe (10 mg/ml) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 95°C erhitzt. Die denaturierten Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die im Überstand verbliebene Plasmid-DNA mittels 3 M Natriumacetat, pH 7,2 und 0,7 Volumen 2-Propanol präzipitiert. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70% Ethanol wurde die pelletierte Plasmid-DNA in H₂O_{demin.} aufgenommen. Diese Methode eignet sich vorrangig zur Isolation von Plasmiden <15 kb.

STET-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0
0,1 M NaCl
1 mM EDTA pH 8
5% (v/v) Triton X-100

3.3.1.3 Isolation natürlicher Plasmide aus *Pantoea agglomerans*

Diese Methode beruht auf dem Zellaufschluss über alkalische SDS-Lyse (Kado & Liu, 1981). Für die Präparation der natürlichen Plasmide aus *P. agglomerans*-Stämmen, wurden die Zellen in 166 µl EDTA (pH 8,0) resuspendiert und durch Zugabe von frisch hergestelltem 333 µl Lysepuffer (0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS) lysiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte zur Entfernung der Zellbestandteile der erste Extraktionsschritt mit 400 µl Phenol und 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Die Phasentrennung erfolgte durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und anschließend 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Aliquots der wässrigen Phase wurden nachfolgend direkt für die

elektrophoretische Auftrennung der natürlichen Plasmide in einem 0,8%igen Agarosegel eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 2 V/cm mit einem hochmolekularen DNA-Größenstandard (High MW DNA Markers; Invitrogen, Karlsruhe) als Referenz durchgeführt.

3.3.2 Isolation genomischer DNA

Da *E. amylovora* und verwandte Bakterienstämme große Mengen Polysaccharid produzieren, wurde das kationische Detergenz Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bei der DNA-Extraktion eingesetzt. Polysaccharide und Proteine werden bei hoher Salzkonzentration durch CTAB komplexiert und können so von den Nukleinsäuren abgetrennt werden.

Für die DNA-Isolation wurden Bakterienzellen in 580 µl 10 mM EDTA resuspendiert und 7 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben. Nach 2 min Inkubation erfolgte der Zellaufschluß durch Zusatz von 4 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 32 µl 10% (w/v) SDS und anschließender einstündiger Inkubation bei 37°C. Zur Entfernung von Proteinen und Polysacchariden wurden 107 µl 5 M NaCl und 85 µl CTAB/NaCl (10% (w/v) CTAB; 0,7 M NaCl) hinzugegeben, 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm. Die wässrige Phase wurde mit 650 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde ein letzter Extraktionsschritt mit 550 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) angeschlossen und die nach Zentrifugation in der wässrigen Phase verbliebene DNA mit 0,7 Volumen 2-Propanol präzipitiert. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70% Ethanol wurde die genomische DNA in H₂O_{demin.} resuspendiert.

3.3.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Galactose-Resten des Agarosepolymers durch die hohe Konzentration an chaotrophen Salz im QX1-Puffer gespalten. Die durch das Auflösen der Agarose freigewordene DNA wird an die Silica-Gelpartikel der QIAEX II-Suspension gebunden und nach drei Waschschritten mit H₂O_{demin.} eluiert. Die gereinigte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.4 Elektrophorese- und Transfertechniken

3.4.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Separierung linearer, doppelsträngiger DNA entsprechend ihrer Größe beruht in einem elektrischen Feld darauf, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA zum positiven Pol umgekehrt proportional zum \log_{10} der Anzahl der Basenpaare ist.

Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 0,2 Volumen 6x Ladepuffer versetzt und nachfolgend in Gelen mit 0,6-1,5% (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer bei 3-5 V/cm aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden DNA-Standards (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen, Karlsruhe) mitgeführt. Die DNA wurde anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) gefärbt und bei 312 nm dokumentiert.

50xTAE (1 Liter):

242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA pH 8

6xLadepuffer:

0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
40% (w/v) Saccharose

3.4.2 DNA-Transferblot (Southernblot)

3.4.2.1 DNA-Markierung mit Digoxigenin

Die Markierung erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin (DIG)-11-dUTP in die DNA. Das sterioide Hapten DIG kann in einem nachfolgenden Enzym-Immunoassay detektiert werden. Für die Markierungsreaktion wurde der ‚DIG DNA labeling and detection Kit‘ der Firma Roche (Mannheim) verwendet.

Um einzelsträngige DNA zu erhalten, wurden 0,5-3 µg DNA, die in 15 µl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ gelöst waren, 10 min gekocht und danach sofort in einem Eis/Ethanol-Bad abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl Hexanukleotidmix, 2 µl dNTP Markierungslösung und 1 µl Klenow-Enzym zugesetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei wird ausgehend von den Hexanukleotid-Zufallsprimern der komplementäre DNA-Strang unter Einbau des DIG markierten Nukleotids synthetisiert. Durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 2,5 µl 4 µl LiCl und 75 µl eiskalten 95%igem Ethanol wurde die Reaktion gestoppt und die DNA gefällt. Nach anschließender Zentrifugation und Waschen mit 70%igem Ethanol, wurde die DNA-Sonde in 50 µl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ resuspendiert und konnte bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

3.4.2.2 Southernblot-Hybridisierung

Die mit Restriktionsenzym behandelte DNA wird aus einem Agarosegel auf einen Membranfilter übertragen und anschließend unter denaturierenden Bedingungen mit einer markierten DNA-Sonde inkubiert. Dabei hybridisiert die Sonde mit homologen DNA-Abschnitten. Diese Hybride können aufgrund der Markierung der Sonde mit DigoxigenindUTP durch spezifische Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden.

Nach elektrophoretischer Separierung der DNA (3.4.1.), wurde das Agarosegel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt, dokumentiert und anschließend kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ gewaschen. Um die DNA zu depurinieren, wurde das Gel 10 min bei Raumtemperatur in Lösung A (0,25 M HCl) inkubiert. Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Inkubation für 2 x 10 min in Lösung B (1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH).

Anschließend wurde die DNA mittels VacuBlot-System auf eine Nylon-Membran (Hybond N⁺, Amersham Buchler, Braunschweig) übertragen. Der Transfer wurde bei einem Vakuum von 100 mbar und 500 mbar jeweils 30 min in 2 x SSC durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer wurde die DNA 3 min im UV-Licht bei 312 nm an die Membran fixiert. Die getrocknete Membran konnte direkt weiter behandelt oder bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1-2 h in 20 ml Hybridisierungsmix je nach gewünschter Stringenz bei einer Temperatur von 52-68°C im Hybridisierungssofen (PersonalHyb, Stratagene, Heidelberg) prähybridisiert. Die mit DIG markierte DNA-Sonde wurde 10 min bei 95°C denaturiert und dann sofort in einem Eis/Ethanol-Bad abgekühlt. Die einzelsträngig vorliegende Sonde wurde in 5 ml frischem, vorgewärmten Hybridisierungsmix aufgenommen, in die Hybridisierungsröhre mit der Membran gegeben und für mindestens 16 h inkubiert. Anschließend wurde der Hybridisierungsmix mit der Sonde dekantiert und bis zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert.

Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran erst mit niedriger Stringenz 2 x 5 min in je 50 ml 2 x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur und dann mit hoher Stringenz 2 x 10 min mit je 50 ml 0,1 x SSC/0,1% SDS bei der ursprünglichen Hybridisierungstemperatur gewaschen.

Für die immunologische Detektion wurden folgende Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst wurde die Membran 1 min in Puffer 1 und danach 30 min mit Puffer 2 inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit Puffer 1 wurde die Membran zusammen mit der Antikörperlösung luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt und 30 min inkubiert, wobei

die Antikörper an DIG binden können. Die Fab-Fragmente der Antikörper sind mit dem Enzym ‚Alkalische Phosphatase‘ (AP) konjugiert. Die Membran wurde anschließend 2 x 15 min in Puffer 1 gewaschen und dann 3 min für die Detektion in Puffer 3 äquilibriert. Der Nachweis der AP erfolgte entweder colorimetrisch oder fluorimetrisch. Für den Farbnachweis diente 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) als AP-Substrat, das nach seiner Dephosphorylierung und anschließender Oxidation in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), das bei dieser Reaktion zu einem ebenfalls blauen Farbstoff reduziert wird. Die Membran wurde für diese Nachweismethode in 10 ml Farbsubstrat-Lösung bis zum Erscheinen der Signale im Dunkeln inkubiert. Die Umsetzung des ECF-Substrats (Amersham Bioscience, Freiburg) in ein fluoreszierendes Produkt durch die AP wurde mit dem Phospho-Imager/ Fluorimager MD STORM 860 (Molecular Dynamics, New York, USA) detektiert. Das Produkt besitzt ein breites Anregungsspektrum mit einem Maximum bei 430 nm und ein Emissionsmaximum bei 560 nm. Der MD STORM 860 scannt die Membran mit einer Auflösung von 100 µm/ Pixel im Modus ‚blue chemifluorescence‘. Die Signalverarbeitung erfolgt mit dem Programm Image Quant (Molecular Dynamics, New York, USA).

20 x SSC:

3 M NaCl
0,3 M tri-Natriumcitrat Dihydrat
pH 7,0 mit NaOH einstellen

Hybridisierungsmix:

5 x SSC
0,1% (w/v) N-Laurylsarcosin
0,02% (w/v) SDS
1% (w/v) Blockingreagenz (Roche, Mannheim)

2 x SSC/0,1% SDS (100 ml):

10 ml 20 x SSC
1 ml 10% (w/v) SDS

0,1 x SSC/0,1% SDS (100 ml):

1 ml 20 x SSC
1 ml 10% SDS

Puffer 1:

100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl

Puffer 2:

0,5% (w/v) Blockingreagenz in
Puffer 1

Puffer 3:

100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂ x 6 H₂O

Antikörper-Lösung:

4 µl Anti-Digoxigenin-AP, Fab
Fragmente (Roche, Mannheim)
20 ml Puffer 1

Farbsubstrat-Lösung:

200 µl NBT/BCIP-Stammlösung
(Roche, Mannheim)
10 ml Puffer 3

3.5 Klonierungstechniken

Die für die Konstruktion und Klonierung von Plasmiden angewandten Techniken entsprachen den von Sambrook & Russel (2001) beschriebenen Standardmethoden. Restriktionsenzyme sowie alle folgenden modifizierenden Enzyme wurden vornehmlich von der Firma Amersham Bioscience (Freiburg) bezogen: Klenow Fragment of DNA

Polymerase I (5 U/μl), T4 DNA Ligase (1 und 5 U/μl), Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/μl).

3.5.1 Vektoren/Plasmide

Tab. 4. Verwendete Vektoren und Plasmide.

Plasmid	Charakteristika	Quelle
pBluescript II SK(+)	Amp ^R , ColE1, f1+, <i>'lacZα</i> , 300-500 Kopien, Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
pBBR1MCS	Cm ^R , Rep, <i>mob</i> , <i>'lacZα</i> , Klonierungsvektor	Kovach et al., 1994
pBBR1MCS-2	Km ^R , Rep, <i>mob</i> , <i>'lacZα</i> , Klonierungsvektor	Kovach et al., 1995
pCAM140	Sm ^R Sp ^R Amp ^R , R6K, enthält mTn5SS <i>gusA40</i> (promotorloses <i>gusA</i> für transkriptionelle Fusionen), Suizidplasmid für <i>E. amylovora</i>	Wilson et al., 1995
pCAM140-NotI	Sm ^R Sp ^R Amp ^R , R6K, enthält mTn5SS40, <i>gusA</i> durch <i>NotI</i> entfernt	H. Weingart
pCAM140-MCS	Amp ^R , R6K, pCAM140-Derivat, enthält ‚multi cloning site‘ von pBluescript II SK(+)	diese Arbeit
pfd4	Cm ^R Km ^R , fd <i>ori</i> , Suizidvektor für <i>E. amylovora</i>	Geider et al., 1985
pMKm	Km ^R , enthält 1,7 kb-Km-Resistenzkassette	Murillo et al., 1994
pBBR.mde6	Cm ^R , <i>PstI</i> -Fragment mit <i>norM</i> aus <i>E. amylovora</i>	diese Arbeit
pBBR.norM	Cm ^R , 3,2 kb- <i>ClaI</i> -Fragment mit <i>norM</i> aus <i>E. amylovora</i>	diese Arbeit
pBlue.mde4	Amp ^R , 3,2 kb- <i>ClaI/PstI</i> -Fragment mit <i>norM</i> aus <i>E. amylovora</i>	diese Arbeit
pBlue.mde4-Cm	Amp ^R Cm ^R , pBlue.mde4-Derivat mit Cm-Resistenzkassette in <i>EcoRV</i> -Schnittstelle von <i>norM</i>	diese Arbeit
pCAM.nor-Cm	Amp ^R Cm ^R , Insert von pBlue.mde4-Cm in pCAM140-MCS	diese Arbeit
pBBR2.norM	Km ^R , 3,2 kb- <i>ClaI</i> -Fragment mit <i>norM</i> aus <i>E. amylovora</i>	diese Arbeit
pBBR.norM-Ec	Cm ^R , 2,4 kb- <i>HindIII/XbaI</i> -Fragment mit <i>norM</i> aus <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pBBR.acr2	Cm ^R , enthält 8,2 kb- <i>SacI</i> -Fragment mit <i>acrAB</i> -Operon und <i>acrR</i>	diese Arbeit
pBBR.acrB5	Cm ^R , enthält 3,1 kb- <i>SacI/BamHI</i> -Inserts mit <i>acrB</i>	diese Arbeit
pBBR.acrB5-Km	Cm ^R Km ^R , pBBR.acrB5-Derivat mit Km-Resistenzkassette in <i>SacII</i> -Schnittstelle von <i>acrB</i>	diese Arbeit
pCAM.acr-Km	Amp ^R Km ^R , Insert von pBBR.acrB5-Km in pCAM140-MCS	diese Arbeit
pBBR.egfp.TIR	Cm ^R , enthält promotorloses <i>egfp</i> unter der Kontrolle von <i>Plac</i>	H. Weingart
pBBR.egfp.acrA	Cm ^R , enthält 1 kb- <i>BamHI</i> -Fragment von Promotorregion von <i>acrAB/acrR</i> , 5'-Bereich von <i>acrA</i> transkriptionell fusioniert zu <i>egfp</i>	diese Arbeit
pBBR.egfp.acrR	Cm ^R , enthält 1 kb- <i>BamHI</i> -Fragment von Promotorregion von <i>acrAB/acrR</i> , 5'-Bereich von <i>acrR</i> transkriptionell fusioniert zu <i>egfp</i>	diese Arbeit
pTGS1/1, 1/5, 1/7, 1/12, 1/39, 2/10, 2/13, 2/23, 2/30, 2/33, 2/36, 2/44	Cm ^R Km ^R , enthalten Entranceposon aus TGS an verschiedenen Stellen des Plasmids pBBR.acr2	diese Arbeit

3.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

3.5.2.1 Transformation in CaCl_2 -kompetente *E. coli*-Zellen

Bei *E. coli* kann durch chemische Einflüsse eine Kompetenz zur Aufnahme von DNA-Molekülen in die Zelle erzeugt werden. Bei der Behandlung mit eiskalter CaCl_2 -Lösung können etwa 10^6 - 10^7 Transformanden/ μg superhelikale Plasmid-DNA erzielt werden (Cohen et al., 1972).

250 ml LB-Flüssigmedium wurden mit *E. coli* aus einer 16 h-Vorkultur mit einer $\text{OD}_{600} = 0,1$ inokuliert und bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte stündlich, bis eine $\text{OD}_{600} = 0,45$ erreicht wurde. Die Kultur wurde sofort 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 250 ml eiskalter 0,1 M MgCl_2 -Lösung resuspendiert. Anschließend wurde erneut 3 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 250 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 10 ml eiskalte Glycerin/ CaCl_2 -Lösung (0,1 M CaCl_2 , 15% (v/v) Glycerin) aufgenommen und jeweils in 200 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden 10-100 μl DNA-Lösung zu 200 μl kompetenten Zellen pipettiert und das Gemisch 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde durch einen bei 5 min und 37°C durchgeführten Hitzeschock induziert. Anschließend wurden 700 μl LB-Medium zugegeben, die Zellsuspension 45 min bei 37°C inkubiert und Aliquots des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika plattiert.

Durch Zugabe des chromogenen Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) können rekombinante Plasmide durch stattfindende α -Komplementation identifiziert werden (Ullmann et al., 1967). Das Plasmid enthält einen Teil des Amino-Terminus des Enzyms β -Galactosidase, in den ein Polylinker eingebettet ist, und das Empfängerbakterium den Carboxy-Terminus (*lacZ* Δ M15-Stämme). Assoziieren beide Fragmente, entsteht ein intaktes Enzym, das X-Gal in Galactose und 5-Brom-4-indoxyl hydrolysiert (Horwitz et al., 1964). 5-Brom-4-indoxyl dimerisiert zu der blauen unlöslichen Verbindung 5,5'-Dibrom-4,4'-chlorindigo. Enthält der Polylinker des Plasmids ein Insert, so unterbleibt die Entstehung eines vollständigen Amino-Terminus und somit die Blaufärbung der Kolonie durch X-Gal-Umsetzung.

X-Gal-Lösung (Roth, Karlsruhe):

40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium (Stammlösung: 20 mg/ml Dimethylformamid)

3.5.2.2 Transformation in elektrokompente Zellen

Diese Methode wurde verwendet, um Plasmide in *E. coli*, *E. amylovora* und *P. agglomerans* zu transformieren. Die DNA-Aufnahme geschieht durch die kurzzeitige Erzeugung von Poren in der Bakterienmembran durch eine angelegte Hochspannung.

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen, wurden 250 ml LB-Medium mit Bakterien aus einer 16 h-Vorkultur mit einer $OD_{600} = 0,1$ inokuliert und inkubiert, bis eine $OD_{600} = 0,5-0,8$ erreicht wurde. Die Kultur wurde sofort 15-30 min auf Eis gekühlt und alle weiteren Protokollschritte unter gekühlten Bedingungen durchgeführt. Nach einer anschließenden Zentrifugation von 5 min bei 5000 rpm wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 250 ml $H_2O_{demin.}$ resuspendiert. Einer Zentrifugation von 10 min bei 5000 rpm folgte erneut die Resuspension des Pellets in 125 ml $H_2O_{demin.}$ Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 5 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 μ l 10% (v/v) Glycerin aufgenommen und jeweils in 40 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

Zur Transformation wurden elektrokompente Zellen mit 1-4 μ l 0,1-5 μ g Plasmid-DNA versetzt und 30-60 s auf Eis inkubiert. Dieses Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Spaltbreite überführt und die Elektroporation mit dem GenePulser (BioRad, München) mit folgenden Einstellungen durchgeführt: elektrischer Puls: 25 μ F/2,5 kV und 200 Ω Widerstand. Dabei werden kurzzeitig hydrophile Poren in der Bakterienmembran erzeugt (Weaver, 1993). Eine hohe Transformationsrate wurde nach einem elektrischen Puls mit einer Feldstärke von 12,5-15 kV/cm und einer Zeitkonstanten von 4,5-5,5 ms erzielt, wobei etwa 50% der Zellen überlebten. Im Anschluß wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h inkubiert, *E. coli* bei $37^{\circ}C$, *E. amylovora* und *P. agglomerans* bei $28^{\circ}C$. Aliquots der Zellsuspension wurden auf einen entsprechenden Selektivagar plattiert.

SOC (1 Liter):

20g Trypton
1 g Hefeextrakt
5 g NaCl
1 ml 1 M KOH nach Autoklavieren: 1 ml 1 M $MgCl_2$

3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet, die zwischen bekannten Sequenzbereichen liegen (Saiki et al., 1988). Aufgrund der bekannten Sequenz können zwei Oligonukleotide (Primer) abgeleitet werden, von denen der eine komplementär zum kodierenden Strang, der andere komplementär zum nicht-

kodierenden Strang ist. Nach Denaturierung der Matritzen-DNA (Template) und Anlagerung der Primer (Annealing) an die Einzelstränge erfolgt, ausgehend vom Primer, die DNA-Synthese (Extension). Anschließend werden DNA und Primer wieder denaturiert und ein erneutes Annealing ermöglicht, so dass die DNA-Fragmente exponentiell amplifiziert werden.

Für PCR-Standardanwendungen wurde der ‚*Taq* core kit‘ der Firma Qiagen (Hilden) eingesetzt. Das hitzestabile Enzym *Taq*-DNA-Polymerase hat eine Polymerisationsrate von etwa 2000 Nukleotiden/min bei 72°C, so dass die Extension empirisch 1 min /1000 bp PCR-Produkt mit dem GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt wurde. Hitzestabile DNA-Polymerasen benötigen freie divalente Kationen, wie z.B. Mg^{2+} , das aber auch von dNTPs und Primern gebunden wird. Deshalb wurde die Mg^{2+} -Konzentration für jedes Primerpaar optimiert. Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert (Tab. 5-7). Zur Durchführung der Kolonie-PCR wurden Bakterienzellen direkt ohne vorherigen Aufschluß in den Reaktionsansatz gegeben.

Tab. 5. Amplifikation eines 1 kb-Fragments von *norM* aus *E. amylovora*

Primer 225o2: 5'– GTA CGC CAG GCC TAC TGG –3'			
Primer 225i2: 5'– GGC AGC AGC AGG TTT GTC –3'			
Reaktionsansatz (25 µl):		Methode:	
2,5 µl	10xPuffer	Denaturierung:	94°C 45 s
1 µl	10 mM dNTP	Annealing:	68°C 15 s
2 µl	25 mM $MgCl_2$	Kettenverlängerung:	72°C 2 min
0,5 µl	100 pmol Primer1	30 Zyklen	
0,5 µl	100 pmol Primer2		
1 µl	300 ng/µl Template-DNA		
17,3 µl	H_2O _{demin.}		
0,2 µl	5 U/µl <i>Taq</i> Polymerase		

Tab. 6. Amplifikation eines 1,8 kb-Fragments von *acrB* aus *E. coli*

Primer <i>acrB</i> _Ec_fwd1: 5'– CAC GCT AAC AAT GTT CGG –3'			
Primer <i>acrB</i> _Ec_rev1: 5'– GCA CCA GTA CTG ATA ACC –3'			
Reaktionsansatz (25 µl):		Methode:	
2,5 µl	10xPuffer	Denaturierung:	94°C 45 s
1 µl	10 mM dNTP	Annealing:	60°C 15 s
1 µl	25 mM $MgCl_2$	Kettenverlängerung:	72°C 2 min
0,5 µl	100 pmol Primer1	30 Zyklen	
0,5 µl	100 pmol Primer2		
1 µl	300 ng/µl Template-DNA		
18,3 µl	H_2O _{demin.}		
0,2 µl	5 U/µl <i>Taq</i> Polymerase		

Tab. 7. Amplifikation eines 3 kb-Fragments von *acrB* aus *E. amylovora*

Primer <i>acrB_fwd2</i> : 5'– GCC GAT TGA GCA ATA TCC –3'			
Primer <i>acrB_rev2</i> : 5'– CAC AGG ATG GCT GTG TTC –3'			
Reaktionsansatz (25 µl):		Methode:	
2,5 µl	10xPuffer	Denaturierung:	94°C 45 s
1 µl	10 mM dNTP	Annealing:	68°C 15 s
2 µl	25 mM MgCl ₂	Kettenverlängerung:	72°C 3 min
0,5 µl	100 pmol Primer1	30 Zyklen	
0,5 µl	100 pmol Primer2		
1 µl	300 ng/µl Template-DNA		
17,3 µl	H ₂ O _{demin.}		
0,2 µl	5 U/µl <i>Taq</i> Polymerase		

3.7 Mutagenese durch Rekombination

3.7.1 Sequenzspezifische Rekombination

Durch sequenzspezifische Rekombination, die zwischen homologen DNA-Sequenzen eines Donor- und Rezipientenmoleküls stattfindet, können gerichtet Mutationen in ein Gen eingefügt werden. Basierend auf diesem Mechanismus erfolgte die Herstellung einer *norM*- und *acrB*-Mutante von *E. amylovora* GSPB 1189 durch Integration einer Antibiotikumresistenz in die entsprechenden Gene.

Für die Mutagenese wurden Suizidplasmide konstruiert, die einen DNA-Abschnitt des zu mutagenisierenden Gens enthielten, in den die Antibiotikumresistenz eingebaut wurde. Als Suizidplasmid wurde ein Derivat von pCAM140 (Wilson et al., 1995) verwendet, aus dem das miniTn5 und die Transposase mittels der Restriktionsendonukleasen *SalI* und *EcoRI* entfernt wurden. Anschließend wurde durch ‚blunt end‘-Ligation die ‚multi cloning site‘ des Vektors pBluescript II SK inseriert. Zuvor wurde die ‚multi cloning site‘ mit einer in die *PstI*-Schnittstelle inserierten Km-Resistenzkassette markiert. Im Anschluß wurde die Resistenzkassette entfernt und der Vektor mit pCAM140-MCS bezeichnet. Der Vektor besitzt den Pi-Protein abhängigen Replikationsursprung des Plasmids R6K und kann sich somit nur in Zellen replizieren, die das für Pi kodierende *pir*-Gen besitzen. In *E. coli* kann das Pi-Protein *in trans* durch den lysogenen Bakteriophagen Lambda, in den das *pir*-Gen kloniert wurde, zur Verfügung gestellt werden. Diese *E. coli*-Stämme werden zusätzlich mit λ -*pir* bezeichnet.

Die Transformation der Suizidplasmide erfolgte durch Elektroporation (3.5.2.2.) in *E. amylovora*. Die Bakterienzellen wurden anschließend 1 h bei 28°C inkubiert, durch Zentrifugation pelletiert und auf AMM2-Agarplatten plattiert. Die Agarplatten enthielten entsprechend der in die Gene zu inserierenden Resistenzkassette 25 µg/ml Cm oder 400 µg/ml

Km. Nach 48 h Inkubation bei 28°C wurde die in den Transformanden stattgefundene Rekombination überprüft. Etwa 100 Kolonien wurden parallel auf 100 µg/ml Km enthaltende LB-Agarplatten und 800 µg/ml Amp enthaltende AMM2-Agarplatten geimpft. Fand nur ein einfaches Crossover statt, wurde das gesamte Plasmid in das Gen inseriert und die Kolonien waren resistent gegen Amp. Die durch ein doppeltes Crossover gegen Amp empfindlichen Kolonien wurden nachfolgend mittels PCR (3.6.) und Southernblot (3.4.2.) untersucht. Die Phänotypen der so erzeugten *norM*- und *acrB*-Mutanten von *E. amylovora* konnten nachfolgend charakterisiert werden.

3.7.2 Unspezifische Rekombination durch Transposoninsertion

Mutationen an beliebigen Stellen eines Genoms können durch Insertionen transponierbarer Elemente, wie Insertionssequenzen oder Transposons, über unspezifische Rekombination erzeugt werden. Für die *in vitro* Mutagenese von *P. agglomerans* 2b/89 wurde ein von Tn5 abgeleitetes Transposon verwendet (Wilson et al., 1995). Es sollten Mutanten hergestellt werden, die Veränderungen in der Biosynthese des Antibiotikums aufweisen.

Die Mutagenese wurde mit dem Plasmid pCAM-Not durchgeführt, das von Dr. H. Weingart (International University Bremen) zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid ist ein Derivat von pCAM140, bei dem das Reportergen *gusA* aus dem Transposon entfernt wurde, so dass die Resistenzkassette gegen Spectinomycin und Streptomycin erhalten blieb. Bei dem resultierenden Transposon mTn5SS40 ist das Resistenzgen flankiert von den IR- (inverted repeats) Sequenzen des Tn5. Das Transposase-Gen, abgeleitet von IS50_R befindet sich *in cis* außerhalb dieser IR-Region.

Für die *in vitro*-Transposition wurde das Plasmid pCAM-Not in *P. agglomerans* 2b/89 elektroporiert (3.5.2.2.). Die Bakterien wurden 1 h in SOC-Medium bei 28°C inkubiert, anschließend durch Zentrifugation pelletiert und in AMM2-Medium (3.1.4.) resuspendiert. Die Suspension wurde auf 200 µg/ml Spectinomycin enthaltende AMM2-Agarplatten plattiert und 48 h bei 28°C inkubiert.

Die Überprüfung der Antibiotikumproduktion der Mutanten erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Agardiffusionstests. Dafür wurden AMM2-Agarplatten hergestellt, in die die *norM*-Mutante von *E. amylovora* inokuliert wurde. Deren Wachstum wird durch das Antibiotikum von *P. agglomerans* 2b/89 gehemmt. Die aus der Mutagenese stammenden Kolonien wurden parallel auf diese Testplatten und LB-Agarplatten mit Spectinomycin geimpft. Nach 20 h Inkubation bei 28°C konnten Mutanten, die keine Wachstums hemmung des Teststammes verursachten, ausgewählt werden. Diese Mutanten wurden nachfolgend in

MM1-Medium bei 28°C kultiviert und die Kulturüberstände wiederum im Agardiffusionstest auf eine Hemmung der *norM*-Mutante überprüft (3.8.1.2.). Konnte weiterhin keine Wachstumsbeeinträchtigung beobachtet werden, wurde angenommen, dass durch die Transposoninsertion die Biosynthese des Antibiotikums gestört wurde.

3.7.3 Unspezifische Rekombination durch den Bakteriophagen Mu

Die Integration der genetischen Information bestimmter Viren in das Wirtsgenom erfolgt ebenfalls über den Mechanismus der unspezifischen Rekombination. Ein Beispiel hierfür ist der temperente Bakteriophage Mu, der an unterschiedlichen zufälligen Stellen im DNA-Molekül integrieren kann (Mizuuchi, 1992). Diese Fähigkeit des Phagens wurde im Template-Generation-System (TGS) (Finnzymes, Espoo, Finnland) genutzt, um die Sequenzierung großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Das TGS ermöglicht das bidirektionale Sequenzieren eines DNA-Fragments, da durch eine Transposon-Insertion zwei Primer-Bindestellen geschaffen werden, von denen aus die zu beiden Seiten des Transposons liegende DNA sequenziert werden kann. Bei der *in vitro* Transposition wird ein DNA-Konstrukt eingesetzt, das als Entranceposon bezeichnet wird (Abb. 6). An den Enden des Entranceposons befinden sich kurze, gegenläufige Wiederholungen von identischen Nukleotid-Sequenzen („inverted repeats“), die die Bindestellen R1 und R2 der MuA-Transposase darstellen. Zwischen den „inverted repeats“ ist eine Km-Resistenzkassette lokalisiert. Zudem enthält das Entranceposon Primer-Bindestellen für einen PCR-Primer (MuEnd) und zwei Sequenzierprimer (SeqA und SeqB).

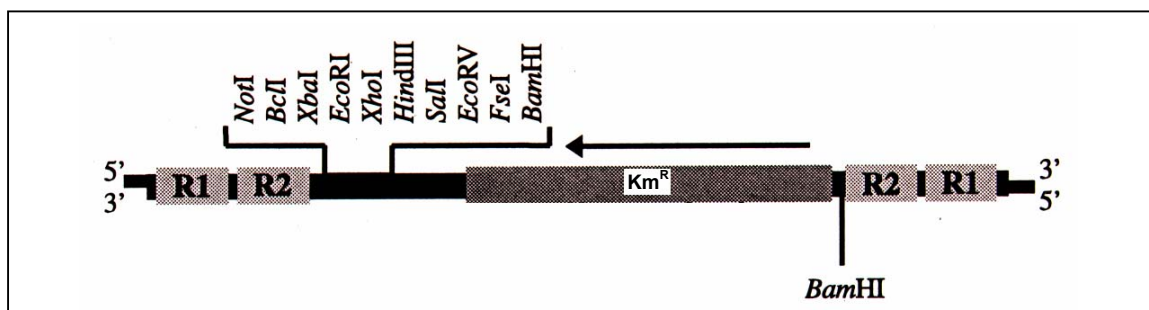


Abb. 4. Entranceposon. R1 und R2 stellen die Bindestellen der MuA-Transposase dar. Km^R, Kanamycin-Resistenzkassette.

Die gereinigte MuA-Transposase kann unter bestimmten Reaktionsbedingungen mit dem Entranceposon einen funktionalen Transpositionscomplex bilden (Savilahti et al., 1995). Diese Transpositionskomplexe inserierten zufällig in die Target-DNA (Haapa et al., 1999a,

b). Als Target-DNA wurde das Plasmid pBBR.acr2 eingesetzt, das ein etwa 9,0 kb großes Insert trug. Die *in vitro* Transposition erfolgte während einer 1 h-Inkubation des Reaktionsansatzes bei 30°C. Der Ansatz bestand aus Target-DNA, 4 µl 5 x Reaktionspuffer (125 mM Tris/HCl; 50 mM MgCl₂; 550 mM NaCl; 0,25 % Triton X-100; 50 % (v/v) Glycerin; pH 8,0), 1 µl Entranceposon (20 ng/µl), 1 µl MuA-Transposase (0,22 µg/µl) und H₂O_{demin.} ad 20 µl.

Die optimale Menge an eingesetzter Target-DNA pro Reaktion ist abhängig von der Größe des Plasmids und errechnet sich wie folgt: Target-DNA [ng] = Target-DNA [kb] × 40 ng.

Die Transposition wurde durch die Denaturierung der MuA-Transposase bei 75°C für 10 min gestoppt. Nach einer 1:10 Verdünnung des Reaktionsansatzes in H₂O_{demin.} wurden 10 µl dieser Verdünnung zur Elektroporation von *E. coli* DH5α verwendet. Zur Selektion der Target-DNA mit einer Entranceposon-Insertion wurden Aliquots des Transformationsgemisches auf Km- und Cm-enhaltende LB-Agarplatten plattiert. Im Anschluss an die Inkubation bei 37°C wurde eine Insertionskartierung mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Für eine zuverlässige Kartierung der Entranceposon-Insertion in der Target-DNA wurden zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen pro Insertionsklon durchgeführt. In der einen PCR-Reaktion wurde der MuEnd-Primer in Kombination mit dem pUC Fwd-Primer eingesetzt, während in einer zweiten PCR-Reaktion der MuEnd-Primer und der pUC Rev-Primer Verwendung fanden. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, kann durch diese beiden Primer-Kombinationen die Insert-DNA zu beiden Seiten des Entranceposons amplifiziert werden. Um eine zwei- bis vierfache Redundanz beim Sequenzieren zu erreichen, wurden fünf Kolonien (zehn PCR-Reaktionen) pro 1 kb Target-DNA analysiert.

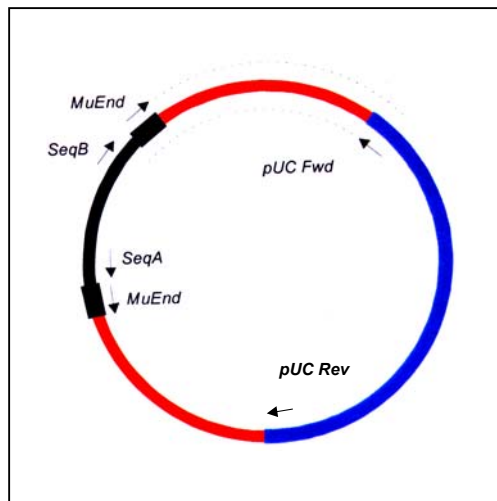


Abb. 5. Insertion des Entranceposons in das Ziel-Plasmid (schwarz). MuEnd ist der PCR-Primer. Bei SeqA und SeqB handelt es sich um Sequenzierprimer. Rote Regionen stellen die Insert-DNA und die blaue Region den Vektor dar.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (3.4.1.). Die Länge der PCR-Produkte ist identisch mit dem Abstand zwischen der Insertionsstelle des Entranceposons und der pUC-Primer-Bindestelle von pBBR1MCS. Die Größen der beiden PCR-Produkte eines Klons, die mit den Primern MuEnd und pUC Fwd bzw. MuEnd und pUC Rev entstanden, ließen sich zur Größe der Insert-DNA des Target-Plasmids addieren. PCR-Reaktionen, die kein Produkt oder längere Produkte als die Insert-DNA ergaben, deuteten darauf hin, dass die Entranceposon-Insertion in die Vektor-DNA erfolgte.

Nachdem die TGS-Klone ihrer Größe nach geordnet und erneut in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, konnten Klone ausgewählt werden, die sich zum Sequenzieren eigneten. Die Sequenzierung wurde durch die Firma GATC (Konstanz) mit den Sequenzierprimern SeqA und SeqB vorgenommen.

Primer pUC Fwd: 5' – AGC TGG CGA AAG GGG GAT GTG –3'

Primer pUC Rev: 5' – TTA TGC TTC CGG CTC GTA TGT TGT GT –3'

Primer MuEnd: 5' – GTT TTT CGT GCG CCG CTT CA –3'

Primer SeqA: 5' – ATC AGC GGC CGC GAT CC –3'

Primer SeqB: 5' – TTA TTC GGT CGA AAA GGA TCC –3'

Reaktionsansatz (25 µl) für Kolonie-PCR:

2,5 µl	10xPuffer
1 µl	10 mM dNTP
2 µl (4 µl) ¹	25 mM MgCl ₂
0,5 µl	100 pmol Primer1
0,5 µl	100 pmol Primer2
18,3 µl (14,3 µl)	H ₂ O <small>demin.</small>
0,2 µl	5 U/µl <i>Taq</i> Polymerase

¹ bei Amplifikaten >3 kb

Methode:

Denaturierung:	94°C	2 min
Annealing:	68°C	0,15 min
Kettenverlängerung:	72°C	3 min
30 Zyklen		

3.8 Physiologische Charakterisierung von NorM und AcrB von *E. amylovora*

3.8.1 Substratspezifität von NorM und AcrB

Um die Substratspezifität der Multidrug Efflux Proteine NorM und AcrB von *E. amylovora* GSPB 1189 zu charakterisieren, wurde die Resistenz, die durch diese Proteine gegenüber verschiedenen chemischen Verbindungen erlangt wird, bestimmt. Die Erhöhung der Resistenz wurde im Mikrodilutions- und im Agardiffusionstest untersucht. Die Tests beruhen auf einem Vergleich der Wachstumshemmung bei unterschiedlich empfindlichen Bakterienstämmen durch eine bestimmte Wirkstoffkonzentration. Beide Methoden wurden in Anlehnung an standardisierte Vorschriften (DIN 58940; NCCLS M07-A5) durchgeführt.

3.8.1.1 Mikrodilutionstest

Mit Hilfe des Mikrodilutionstest wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) einer Substanz bestimmt. Die MHK gibt die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffs an, bei der das Wachstum der Bakterien vollständig gehemmt wird. Die Tests wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt und die Bakterien abgestuften Konzentrationen der jeweiligen Substanz ausgesetzt.

Für die Herstellung von *E. coli*-Inocula wurden die Stämme TG1 und KAM3 verwendet. *E. coli* KAM3 wurde mit dem Vektor pBBR1MCS und den die Multidrug Efflux Proteine enthaltenden Plasmiden pBBR.norM-Ec, pBBR.norM und pBBR.acr2 transformiert (3.5.1.). Alle *E. coli*-Stämme wurden 20 h in Müller-Hinton-Bouillon (MHB) bei 37°C inkubiert. Dann wurde die OD₆₀₀ der Kulturen bestimmt und eine Suspension von 10⁶ Zellen/ml in MHB hergestellt.

Die Mikrotiterplatten wurden wie folgt belegt. Reihe A1-10 wurden mit 180 µl MHB und alle verbleibenden Kavitäten mit 100 µl MHB befüllt. Nach Zugabe von 20 µl der jeweiligen Substanz in Reihe A, erfolgte eine serielle 1:2 Verdünnung (3 Parallelen je Substanz). Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension zugegeben, so dass das Gesamtvolumen pro Kavität 200 µl betrug. Die Auswertung erfolgte nach 24 h und 48 h Inkubation bei 37°C, wobei die MHK visuell bestimmt wurde. Von den Unterschieden in der Wachstumshemmung des *E. coli*-Stammes KAM3 und seinen Transformanten wurde auf das Substratspektrum der heterolog exprimierten Transportproteine NorM und AcrB aus *E. amylovora* geschlossen.

Ebenfalls im Mikrodilutionstest wurde *E. amylovora* mit seiner *norM*- und *acrB*-Mutanten verglichen sowie die Komplementation der Mutanten überprüft. Dafür wurden die Stämme in AMM2-Medium (3.1.4.) bei 28°C inkubiert, eine Inokulum-Konzentration von 2×10⁶ Zellen/ml in AMM2 hergestellt und weiterhin wie für *E. coli* beschrieben verfahren. Die Auswertung erfolgte nach 24 h und 48 h Inkubation bei 18°C und 28°C.

Müller-Hinton-Bouillon (Becton Dickinson, Heidelberg) 1 Liter:

2 g Fleischextrakt
17,5 g Caseinhydrolysat
1,5 Stärke

Testsubstanzen:

Kanamycin, Nalidixinsäure in 0,1 M NaOH, Tetracyclin in 70% Ethanol (Amresco, Solon, Ohio, USA); Ethidiumbromid (Biomol, Hamburg); Ciprofloxacin in 0,1 M NaOH, Quercetin in Methanol (ICN, Eschwege), Berberin in Methanol (Lancaster, Frankfurt am Main), Rifampicin in Methanol (Merck, Darmstadt); Ampicillin, Carbenicillin (Serva, Heidelberg); Norfloxacin in 0,1 M NaOH, Spectinomycin, Kristallviolett, Methylenblau, Phloretin in Ethanol, Phloridzin in Ethanol, Naringenin in Ethanol, (+) -Catechin in Ethanol, Chlorogensäure in Ethanol, Protocatechonsäure in Ethanol, Esculetin in Ethanol, Genistein in Ethanol, Dimethoxychalcon in Ethanol, Salicylsäure (Sigma, Taufkirchen).

3.8.1.2 Agarplattendiffusionstest

Das Prinzip des Agarplattendiffusionstests beruht darauf, dass die Testsubstanz in den Agar diffundiert, der homogen mit einem Testorganismus beimpft ist. Die Konzentration des Wirkstoffs nimmt solange mit der Diffusionsstrecke ab bis ein Diffusionsgleichgewicht erreicht ist. Der Testorganismus wird während des Wachstums einem Konzentrationsgradienten ausgesetzt. Je empfindlicher ein Teststamm ist, um so größer bleibt die wachstumsfreie Zone. Im Vergleich zum Mikrodilutionstest stellt der Agardiffusionstest eine eher qualitative Methode der Empfindlichkeitsprüfung dar.

Die Wirkung von Überständen von Bakterien-Flüssigkulturen und Rohextrakten von Pflanzenblättern auf *E. amylovora* und seinen *norM*- und *acrB*-Mutanten wurde mit dieser Methode untersucht. Zur Herstellung der Inokulum-Bakteriensuspension wurden die Stämme in AMM2-Medium 20 h bei 28°C inkubiert und anschließend die OD₆₀₀ bestimmt. Nach Verdünnung der Zellen mit 0,85% NaCl auf OD₆₀₀ = 1, wurden 50 ml bei 48°C temperierten flüssigen AMM2-Agar mit 500 µl dieser Bakterienuspension inokuliert. Der Testagar wurde in Petrischalen (150×20 mm) gegossen und 12 Löcher mit 1 cm Durchmesser ausgestanzt. Die Stanzlöcher wurden mit 50 µl Testlösung befüllt. Als Refernzsubstanz diente Spectinomycin (5 mg/ml). Die Auswertung erfolgte nach 24 h und 48 h Inkubation bei 18°C und 28°C, wobei der Durchmesser der konzentrischen Wachstumshemmung vermessen wurde. Zwischen dem Durchmesser der Hemmung und dem Logarithmus der Wirkstoffkonzentration besteht eine lineare Beziehung, die zur Konzentrationsermittlung genutzt werden kann.

3.9 Flavonoidextraktion aus Pflanzenblättern

Flavonoide zählen, neben den Isoprenoiden und Alkaloiden, zu den Sekundärmetaboliten höherer Pflanzen und spielen als Phytoalexine eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Pflanzen und Mikroorganismen.

Für die Flavonoidextraktion wurden Blätter von der Apfelunterlage der Sorte MM 106VF (Baumschule H. Lodder, Hiddingsel), von Apfel (*Malus domestica*, „Klarapfel“) von Birne (*Pyrus communis*, „Gute Luise“) und von Birnquitte (*Cydonia oblonga*) (Botanischer Garten, Marburg) verwendet. Etwa 1 g Blattmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert und mit 1 ml Methanol extrahiert. Eine Abtrennung der Pflanzenbestandteile erfolgte durch Zentrifugation. Die antimikrobielle Wirkung des methanolischen Extrakts wurde im Agardiffusionstest überprüft (3.8.1.2.). Bei den Apfelunterlagen wurden Blattextrakte von befallsfreien und von Pflanzen, die mit *E. amylovora* inokuliert wurden, verglichen.

3.10 Pathogenitätstest an Tabak

Der Nachweis der Pathogenität von *E. amylovora* und seiner *norM*- und *acrB*-Mutante erfolgte indirekt über die Auslösung einer hypersensitiven Reaktion (HR) an Tabak. *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havanna SR1 wurde im Gewächshaus (20-25°C, 60% relative Luftfeuchte und ca. 15 000 Lux) in P/T-Einheitserde kultiviert. Für die Inokulation der Pflanzen wurden die Bakterien-Stämme 24 h bei 28°C auf LB-Agar inkubiert und die Zellen der Submerskulturen in H₂O_{demin.} resuspendiert. Die Suspension wurde auf 10⁹Zellen/ml verdünnt und nachfolgend in die Adern der Blattunterseite mit einer Spritze mit Kanüle injiziert. Als negative Kontrolle diente H₂O_{demin.}. Die Entstehung der HR in Form von Nekrosen wurde nach 24 und 48 h Inkubation bewertet.

3.11 Virulenztest an Apfel

3.11.1 Inokulation der Pflanzen durch Prick-Technik

Die Untersuchung der Virulenz wurde an vegetativ vermehrten Apfelunterlagen der Sorte Malus MM 106VF (Baumschule H. Lodder, Hiddingsel) mit einem Durchmesser von 8-10 mm durchgeführt. Die Unterlagen konnten bis zur Verwendung bei 4°C bis 3 Monate gelagert werden. Eine anschließende Kultivierung erfolgte im Gewächshaus (20-25°C, 60% relative Luftfeuchte und ca. 15 000 Lux) in P/T-Einheitserde.

Für die Inokulation der Pflanzen wurden die Bakterien 24 h bei 28°C auf LB-Agar inkubiert. Die Zellen der Submerskulturen wurden in H₂O_{demin.} resuspendiert und Verdünnungen von 10²-10⁶ Zellen/ml hergestellt. Es erfolgte anschließend die Inokulation und eine Lebendzellzahlbestimmung dieser Verdünnungen. Dafür wurden je nach erwarteter Zellzahl Verdünnungsreihen hergestellt und von 3 Verdünnungsstufen je 100 µl auf LB-Agar plattiert. Die Anzahl koloniebildender Einheiten (cfu, colony forming units)/ml wurde nach 48 h Inkubation bei 28°C in Parallelen bestimmt.

Die Inokulation der Bakterien erfolgte an der Triebspitze der Pflanzen durch Prick-Technik. Dabei wird die Triebspitze mit einer Injektionskanüle durchstoßen. Die so entstandenen Wunden dienten als künstliche Eintrittspforten für die Bakterien. Je 5 µl der Bakteriensuspension wurden auf den Durchstich pipettiert. Um die Virulenz von *E. amylovora* und seiner *norM*- und *acrB*-Mutante unter ähnlichen Bedingungen zu vergleichen, wurden die Stämme auf eine Pflanze inokuliert. Die Beurteilung der Virulenz erfolgte zum einen durch die Beschreibung der Symptomausbildung über einen Zeitraum von

3 Wochen, zum anderen durch die Ermittlung der Überlebensrate bei verschiedenen Inokulationskonzentrationen nach einem Tag Inkubation.

3.11.2 Bestimmung der Bakterienpopulation *in planta*

Für die Ermittlung der Überlebensrate wurden je 11×1 cm Stengel um den mit Bakterien inokulierten Bereich in einem Mörser mazeriert und in 10 ml 0,85% NaCl aufgenommen. Von dieser Lösung wurden je nach erwarteter Bakterienzahl entsprechende Verdünnungsreihen hergestellt. Von 4 Verdünnungsstufen wurden je 100 µl entnommen und auf LB-Agar plattiert. Die Bestimmung erfolgte in 3 Parallelen. Nach 48 h Inkubation bei 28°C wurde die Anzahl koloniebildender Einheiten (cfu, colony forming units)/cm Stengel ermittelt.

3.12 Quantifizierung von Promotoraktivitäten durch das Reportergen *egfp*

Die Untersuchungen zur Expression des *acrAB*-Operons und *acrR*-Gens erfolgten mit Hilfe des Reportergens *egfp*. Dazu wurden transkriptionelle Fusionen der Promotorregionen mit dem Reportergen im Vektor pBBR.*egfp*.TIR erzeugt (Dr. H. Weingart, International University Bremen). Dieser Vektor enthält eine ‚translation initiation region‘ mit einer optimierten Shine-Dalgarno Sequenz und dem ‚translational enhancer‘ des Gens 10 aus dem Phagen T7 (Miller & Lindow, 1997), gefolgt vom *egfp*-Gen (BD Biosciences, Clontech, Erembodegem, Belgien), translationalen Stop-Codons in allen drei Leserahmen und dem transkriptionellen Terminator T₀ des Phagen λ (Andersen et al., 1998). Die entsprechenden Plasmide, pBBR.*egfp*.*acrA* und pBBR.*egfp*.*acrR*, wurden mittels Elektroporation in *E. amylovora* transformiert.

Für die Bestimmung der Genexpression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase wurden Flüssigkulturen in AMM2-Medium bei 28°C hergestellt. Nach dem Erreichen verschiedener ODs wurden definierte Mengen an Kulturlösung entnommen (OD₆₀₀ = 0,5: Entnahme von 6 ml, OD₆₀₀ = 1 und 2: Entnahme von 3 ml, ab OD₆₀₀ = 3: Entnahme von 1 ml). Die Proben wurden 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µl PBS-Puffer resuspendiert. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte in Mikrotiterplatten. Dazu wurden die resuspendierten Zellen in die Kavitäten der Reihe A pipettiert und seriell 1:2 mit PBS-Puffer bis in die Reihe H verdünnt. Als Kontrolle zur Bestimmung der Hintergrund-Fluoreszenz diente PBS-Puffer, der in die Kavitäten A1-A12 pipettiert wurde. Die EGFP-Aktivität wurde mit dem Fluorometer Fluorolite 1000 (Dynatech Laboratories, Denkendorf) bei einer Excitation von 470 nm und einer Emission von 516 nm sowie einer Lampenspannung

von 5,0 V vermessen. Die Bestimmung der OD in den Mikrotiterplatten erfolgte mit dem MRX Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Fluoreszenz wurde auf eine $OD_{600} = 0,5$ berechnet.

Der Einfluss von Substraten auf die Expression des *acrAB*-Operons und *acrR*-Gens wurde direkt in Mikrotiterplatten mit Hilfe des unter 3.8.1.1 beschriebenen Mikrodilutionstests untersucht. Als Inokulum diente der mit den Plasmiden pBBR.egfp.acrA und pBBR.egfp.acrR transformierte *E. amylovora*-Wildtyp. Die Aktivität des gebildeten EGFPs und die OD wurden wie oben beschrieben nach 24 h Inkubation gemessen. Da eine Induktion der Promotoraktivitäten nur bei wachstumsinhibierenden Substratkonzentrationen auftrat, wurde die Fluoreszenz auf eine $OD_{600} = 0,1$ berechnet.

PBS (Phosphate buffered saline; pH 7,4; 1 Liter):

8,25 g Na_2HPO_4

2,05 g NaH_2PO_4

4,0 g NaCl

3.13 Isolation von Epiphyten

Zur Untersuchung des Phänotyps der Transporter-Mutanten von *E. amylovora* wurden Antibiotika-produzierende Epiphyten aus Blüten von Wirtspflanzen isoliert. Die Probennahme der Blüten erfolgte von Apfel, Birne, Quitte und Weißdorn unterschiedlicher Standorte, wie Marburg, Bauerbach, Eisemroth und Vacha. Pro Baum wurden 12-15 Blüten in 1 ml 0,85% NaCl/Blüte gemörsert. Von dieser Lösung wurden Verdünnungsreihen hergestellt und je 100 µl auf LB-Agar plattiert. Nach 48 h Inkubation bei 28°C wurden 25-30 Kolonien/Probe auf eine wachstumshemmende Wirkung im Agardiffusionstest überprüft. Dafür wurden *E. amylovora* und seine *norM*- und *acrB*-Mutante in AMM2-Agarplatten als Teststämme eingesetzt. Etwa 55 Kolonien wurden parallel auf eine Platte pro Teststamm geimpft. Nach 48 h Inkubation wurde die Hemmhofbildung beobachtet. Isolate, die eine Wachstumshemmung verursachten, wurden nachfolgend in Flüssigkultur überprüft.

3.14 Antibiotika-Produktion der Epiphyten

Die Produktion wachstumshemmender Substanzen durch pflanzenassoziierte Bakterien erfolgte in Flüssigkultur im Minimalmedium MM1. Die Bakterien-Stämme wurden in Röhrchen in 5 ml Medium 48 h bei 28°C kultiviert. Zur Gewinnung der Überstände, in denen die inhibitorischen Substanzen enthalten waren, wurden die Zellen durch 15 min

Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt. Die Überstände konnten bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

MM1-Medium (1Liter):

1 g KH_2PO_4

1 g K_2HPO_4

1 g NaCl

1 g Na-Citrat

4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2 g D-Glucose

0,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

4 ERGEBNISSE

4.1 Temperaturabhängige Genexpression in *E. amylovora*

Der Infektionsprozeß phytopathogener Bakterien wird von häufig wechselnden Umweltbedingungen beeinflusst (Colhoun, 1973). Dabei hat die Temperatur einen entscheidenden Einfluß auf die Regulation der Expression von Virulenzfaktoren (Smirnova et al., 2001). Aus *E. amylovora* ist bereits die temperaturregulierte Expression des Levansucrase-Gens *lsc* (Bereswill et al., 1997) und einiger Gene, die für Pathogenitätsfaktoren kodieren, beschrieben. Wei et al., 1992 zeigten, dass Gene des für die hypersensitive Reaktion verantwortlichen *hrp*-Regulons in einer temperaturabhängigen Weise exprimiert werden. Von Gaudriault et al., 1997 ist von *dspA*, das für ein Effektorprotein kodiert, eine höhere Expression bei 25°C als bei 30°C bekannt. Unter Verwendung eines Reportergens führte Dr. C. Goyer ein Screening nach weiteren temperaturabhängig exprimierten Genen in *E. amylovora* durch (Goyer & Ullrich, 1999). Dafür wurde der Stamm *E. amylovora* GSPB 1189 mit dem von Tn5 abgeleiteten Transposon mTn5SS*gusA40* (Wilson et al., 1995) mutagenisiert. Dieses miniTn5-Derivat enthält das für die β -Glucuronidase (GUS) kodierende promotorlose *gusA*-Gen und ein Resistenzgen gegen Streptomycin und Spectinomycin (Abb. 6). Insetiert das Transposon im Genom stromabwärts eines aktiven Promotors, so kann die Aktivität dieses Promotors indirekt durch Messung der GUS-Aktivität bestimmt werden.

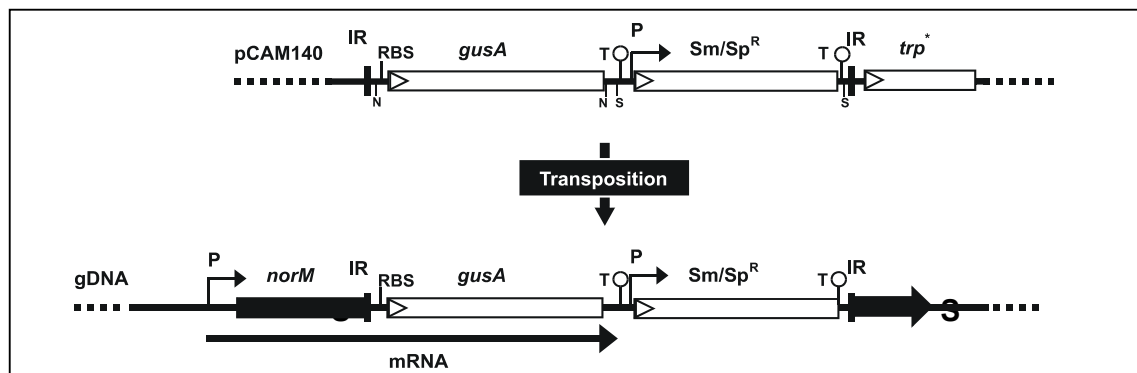


Abb. 6. Mutagenese des Genoms von *E. amylovora* durch Insertion des auf Plasmid pCAM140 gelegenen Transposons mTn5SS*gusA40*. Die Aktivitätsbestimmung eines Promotors (P) wird durch die Entstehung einer transkriptionellen Fusion mit dem Reportergen *gusA* ermöglicht (Beispiel: Gen *norM*). gDNA, genomische DNA; IR, 19 bp umfassende ‚inverted repeats‘ von Tn5; N, *NotI*; RBS, Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz); S, *SfiI*; T, Transkriptionsterminator; Sm/Sp^R, Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz; *trp*⁺, Transposase-Gen von IS50_R (De Lorenzo et al., 1990; Herrero et al., 1990).

Während der ersten Stufe des Screenings wurden über 7000 Transposon-Mutanten im qualitativen GUS-Assay überprüft. Dabei erfolgt eine Umsetzung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronid (X-Gluc) in einen Indigofarbstoff. Die Stärke der Blaufärbung konnte nach paralleler Inkubation der Kolonien bei 18°C und 28°C auf X-Gluc-Platten visuell verglichen werden (Abb. 7).

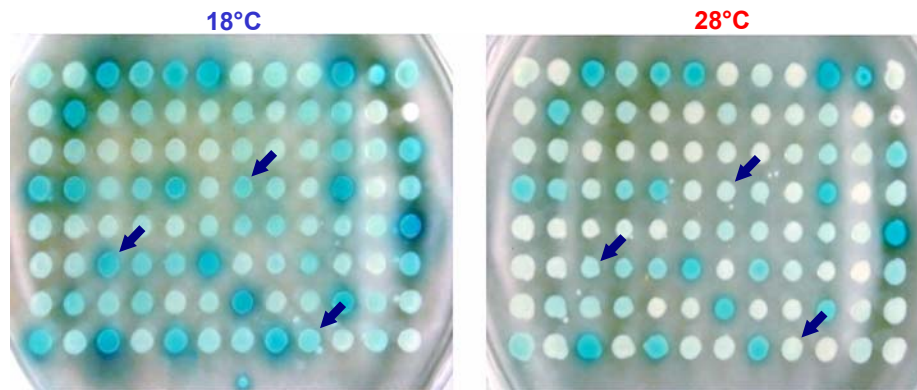


Abb. 7. Qualitativer GUS-Assay. Die Pfeile weisen auf eine erhöhte GUS-Aktivität von Transposon-Mutanten von *E. amylovora* nach einer Inkubation bei 18°C im Vergleich zu parallelem Wachstum bei 28°C hin.

246 Mutanten wiesen temperaturabhängige Unterschiede in der GUS-Aktivität auf, wovon 190 Mutanten eine erhöhte Aktivität bei 18°C besaßen, während 56 Mutanten bei 28°C eine stärkere GUS-Aktivität zeigten. Außerdem traten 4 Mutanten auf, die bei 28°C deutlich schlechter wuchsen als bei 18°C, sowie 2 Mutanten, die β -Glucuronidase bei 28°C, nicht aber bei der niedrigeren Temperatur ins Medium sekretierten (Abb. 8).

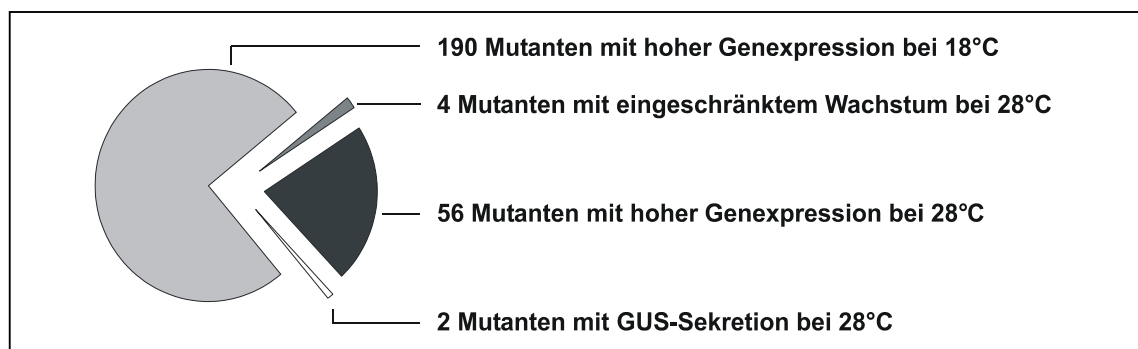


Abb. 8. Zusammensetzung aller Transposon-Mutanten mit temperaturabhängigen Phänotypen basierend auf dem qualitativen GUS-Assay.

E. amylovora infiziert seine Wirtspflanze präferentiell bei hoher Luftfeuchtigkeit und niedriger Temperatur (Norelli & Beer, 1984). Deshalb wurden nachfolgend Mutanten, die

eine erhöhte GUS-Aktivität bei 18°C aufwiesen, näher untersucht. Im quantitativen GUS-Assay wurde der Umsatz von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid durch die Enzym-Aktivität der 190 bei 18°C-induzierten Mutanten fluorometrisch bestimmt. Bei 22 Mutanten konnte die erhöhte Genexpression bei dieser Temperatur bestätigt werden. Mutanten mit mindestens 2fach höherer GUS-Aktivität wurden ausgewählt und die entsprechenden DNA-Abschnitte mit der Transposon-Insertion in pBluescript II SK subkloniert und anschließend sequenziert. Durch Nukleotidsequenz-Vergleiche mit Datenbankeinträgen unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) konnte einem Teil der so analysierten DNA-Abschnitte eine mögliche Funktion zugeordnet werden. Allerdings konnten für 8 Sequenzen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Genen bzw. Genprodukten ermittelt werden (Tab.8). Vier Mutanten enthielten die miniTn5-Insertion in Genen, die für Enzyme des Primärstoffwechsels kodieren. Bei fünf Mutanten waren Gene betroffen, die für Membran-assoziierte Proteine kodieren. Darunter befand sich HofQ, ein Protein der äußeren Membran, das für die Sekretion von Proteinen ins Medium verantwortlich ist. Außerdem wurden Ähnlichkeiten zu einem Flagellenprotein sowie einem Transporter der inneren Membran gefunden. Des weiteren ließen sich *gusA*-Insertionen in Genen identifizieren, deren entsprechende Proteine an DNA binden, wie die Transkriptionsregulatoren Mig-14 oder ToxR. Im Fall einer Mutante war ein Gen getroffen, dessen abgeleitetes Protein Ähnlichkeiten zu einer Proteinase, wie ClpB aus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, besitzt. Es konnten keine Transposon-Insertionen in bereits bekannten temperaturregulierten Genen nachgewiesen werden.

Tab. 8. Datenbankanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von miniTn5-enthaltenden Genen, deren Promotoraktivitäten im GUS-Assay bei 18°C im Vergleich zu 28°C erhöht waren.

Mutante	Protein	Funktion	Organismus	Pos.¹ (%)	Idnt.² (%)
<u>Gruppe 1 (Proteine des Primärstoffwechsels):</u>					
MEA 20	PaaK	Phenylacetat-CoenzymeA-Ligase (Phenylalanin-Metabolismus)	<i>Escherichia coli</i>	47	25
MEA 63	AldD	Aldehyd-Dehydrogenase	<i>Erwinia amylovora</i>	68	46
MEA 124	LacA	Galactosid-O-acetyltransferase (Lactose-Metabolismus)	<i>Escherichia coli</i>	46	33
MEA 246	GADH	Gluconate 2-dehydrogenase (Pentosephosphatweg)	<i>Pectobacterium cypripedii</i>	79	72

Gruppe 2 (Membran-assoziierte Proteine):

MEA 53	HP1080	hypothetisches integrales Membranprotein	<i>Helicobacter pylori</i>	66	41
MEA 60	HofQ (HopQ)	Protein in der äußeren Membran (Export von Proteinen via Typ II-Sekretion)	<i>Escherichia coli</i>	69	50
MEA 107	FliD	Flagellen-Protein	<i>Escherichia coli</i>	59	45
MEA 213	YPO2972	hypothetisches Lipoprotein	<i>Yersinia pestis</i>	89	77
MEA 225	NorM	Protein in der inneren Membran (Multidrug-Efflux-Transport)	<i>Escherichia coli</i>	87	73

Gruppe 3 (DNA-assoziierte Proteine):

MEA 42	XCC2095	hypothetische DNA-Helicase (Transkription)	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	59	43
MEA 65	Mig-14	DNA-Bindeprotein (Transkriptionsregulation von Virulenzfaktoren)	<i>Salmonella enterica</i>	46	32
MEA 163	ToxR	DNA-Bindeprotein (Transkriptionsaktivierung von Virulenzfaktoren)	<i>Vibrio cholerae</i>	55	32
MEA 212	McrB	Restriktionsenzym (Erkennung von 5-Methylcytosin)	<i>Escherichia coli</i>	64	50

Gruppe 4 (Proteasen):

MEA 100	ClpB	ATP-abhängige Protease (Hitzeschockprotein)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi	60	39
---------	------	---	---	----	----

¹ ähnliche Aminosäuren; ² identische Aminosäuren

Für die vorliegende Arbeit wurden die GUS-Aktivitäten nochmals für diejenigen Mutanten quantitativ bestimmt, bei denen das miniTn5 in Gene inserierte, deren abgeleitete Aminosäuresequenz signifikante Ähnlichkeit zu bereits charakterisierten Proteinen besitzt (Abb. 9). Dabei ergab sich für alle Promotoren eine etwa 2-2,5fach erhöhte Aktivität bei 18°C im Vergleich zu 28°C. Für den Promotor des *fliD*-ähnlichen Gens (Mutante MEA107) konnte die höchste Aktivität bei beiden Temperaturen ermittelt werden.

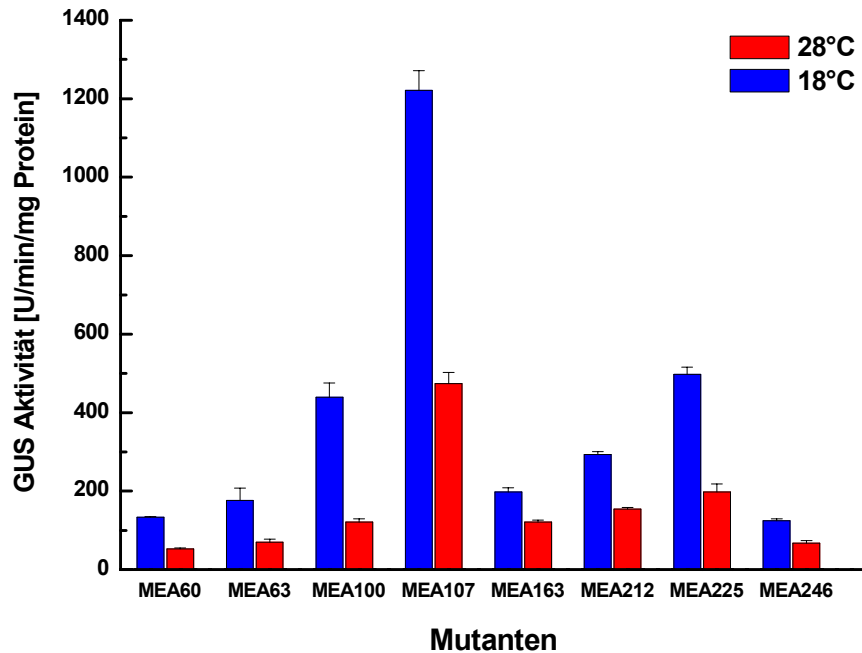


Abb. 9. Quantitativer GUS-Assay. Die Bestimmung der GUS-Aktivitäten der Transposon-Mutanten (MEA) von *E. amylovora* bei 18°C und 28°C erfolgte durch die Mittelung dreier unabhängiger Messungen. Die Probennahme erfolgte bei einer $OD_{600} = 3$.

Da die Probennahme für den quantitativen GUS-Assay jeweils nur bei einer $OD_{600} = 3$ erfolgte, wurden die Daten für die Mutanten MEA107 und MEA225 im Verlauf des Wachstums von Submerskulturen verifiziert (Abb. 10). MEA107 wurde aufgrund seiner hohen GUS-Aktivitäten ausgewählt und MEA225 aufgrund einer möglichen Funktion des *norM*-ähnlichen Gens bei der Virulenz von *E. amylovora*. Die GUS-Aktivität wurde bei unterschiedlichen ODs während des Wachstums der Mutanten in Flüssigkultur bestimmt. Die Kulturen beider Mutanten erreichten sehr ähnliche ODs in der Stationärphase, wobei diese bei 18°C später erreicht wurde als bei 28°C. Hinsichtlich des Wachstums konnte kein Unterschied zum *E. amylovora* Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht dargestellt).

Für Mutante MEA107, bei der *gusA* von dem Promotor eines *fliD*-ähnlichen Gens transkribiert wird, wurde während des frühen exponentiellen Wachstums eine GUS-Aktivität von etwa 200 U/min/mg Protein ermittelt (Abb. 10.A2). Am Ende der exponentiellen Phase erhöhte sich die Aktivität um das 8fache und sank in der späten Stationärphase wieder ab. Im Gegensatz dazu wurde für die Mutante MEA225, die das miniTn5-Derivat in dem *norM*-ähnlichen Gen trägt, eine konstante GUS-Aktivität von etwa 700 U/min/mg Protein im Verlauf der exponentiellen und stationären Wachstumsphase errechnet (Abb. 10.B2). Lediglich in der späten Stationärphase konnte ein Absinken der Aktivität beobachtet werden.

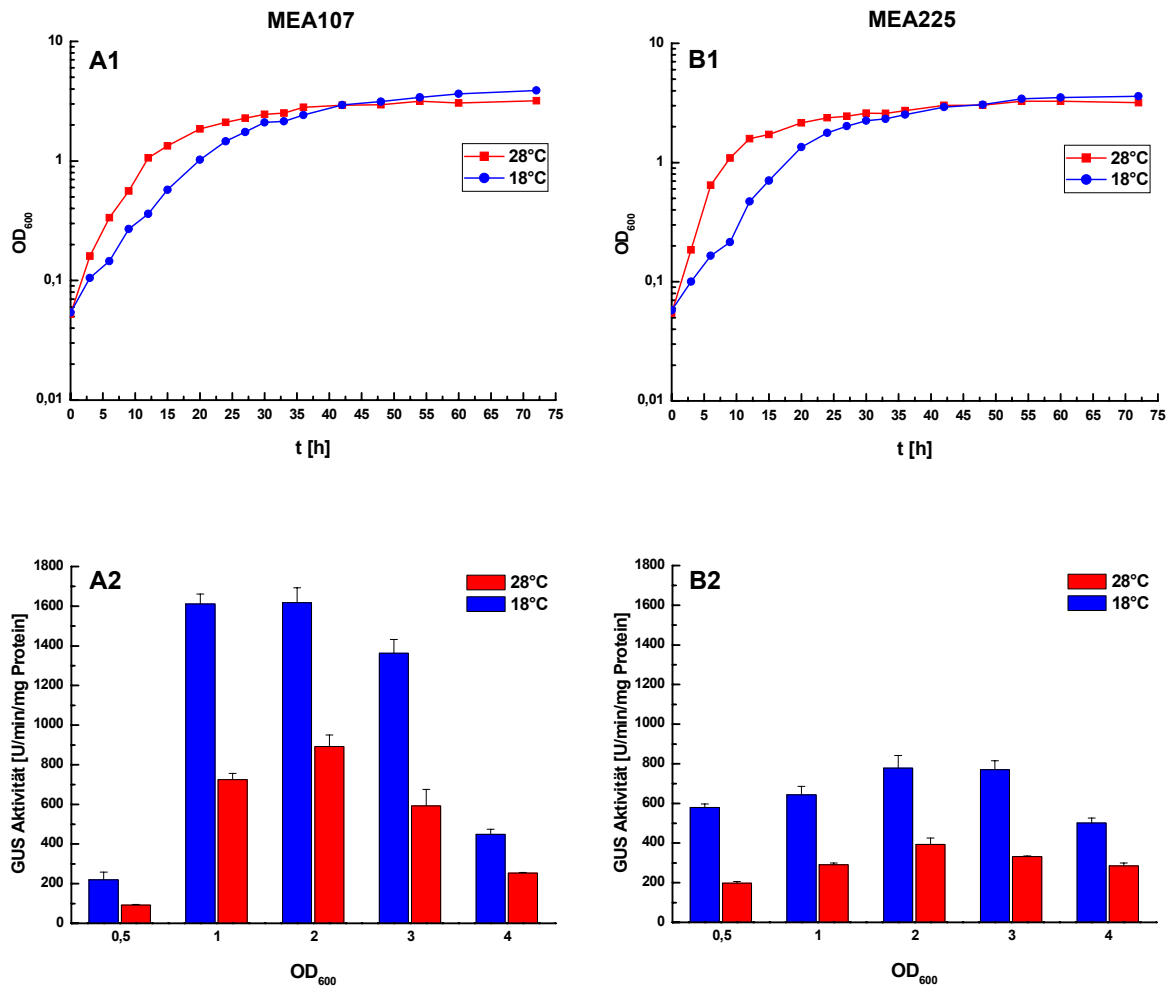


Abb. 10. Quantitativer GUS-Assay von Transposon-Mutante MEA107 und MEA225. Während der Wachstumsphasen einer Submerskultur erfolgte die Bestimmung der GUS-Aktivitäten. **(A1)** Wachstumskurve von MEA107 in 250 ml AMM2-Medium. **(A2)** GUS-Aktivitäten von MEA107 bei unterschiedlichen ODs. **(B1)** Wachstumskurve von MEA225 in 250 ml AMM2-Medium. **(B2)** GUS-Aktivitäten von MEA225 bei unterschiedlichen ODs.

4.2 Klonierung zweier Multidrug-Efflux-Transporter aus *E. amylovora*

Das in der Transposon-Mutante MEA225 identifizierte Gen kodiert wahrscheinlich für ein Multidrug-Efflux-Protein. Diese Proteine transportieren strukturell unterschiedliche, toxische Verbindungen aus der Zelle, so dass deren Wirkung durch eine intrazelluläre Akkumulation verhindert werden kann. Damit zählen diese Transporter zu den Resistenzmechanismen einer Zelle (Walsh, 2000). Da bislang nichts über Multidrug-Efflux-Proteine aus *E. amylovora* und ihren Einfluß auf den Verlauf der Feuerbrand-Erkrankung bekannt war, wurde das bei Mutante MEA225 von der Transposon-Insertion betroffene *norM*-ähnliche Gen für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. Eine Bakterienzelle besitzt meist mehrere Multidrug-Transporter (Paulsen et al., 2000; 2001), so dass ein weiteres dieser Proteine in die

vorliegende Arbeit einbezogen wurde. *E. amylovora* ist als Enterobakterium phylogenetisch nah mit *E. coli* verwandt. Aus *E. coli* konnten bislang verschiedene Multidrug-Efflux-Proteine charakterisiert werden. Dabei vermittelte das AcrAB-Transportsystem eine Resistenz gegenüber einem breiten Substratspektrum und erwies sich als wichtigste Multidrug-Pumpe in *E. coli* (Sulavik et al., 2001; Nishino & Yamaguchi, 2001). Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *E. coli*, sollte ein AcrAB-ähnliches Transportsystem auch in *E. amylovora* GSPB 1189 aufgefunden und charakterisiert werden.

4.2.1 Klonierung von *norM* aus *E. amylovora*

Um das in der Transposon-Mutante MEA225 identifizierte Multidrug-Efflux-Protein physiologisch zu charakterisieren, wurde zunächst das entsprechende Gen aus *E. amylovora* kloniert.

Basierend auf der vorhandenen partiellen Sequenzinformation wurde das Primer-Paar 225o2/225i2 für eine PCR-Reaktion abgeleitet. Das entstandene 1 kb-PCR-Produkt diente zur Sondenherstellung für eine Southernblot-Analyse. Mit Hilfe dieser Analyse sollte geklärt werden, welche Restriktionsenzyme genomische DNA aus *E. amylovora* so schneiden, dass ein DNA-Fragment entsteht, welches das vollständige Gen enthält. Die genomische DNA wurde in getrennten Reaktionen mit *Cla*I, *Kpn*I, *Nae*I, *Pst*I, *Sal*I und *Sph*I behandelt. Die geschnittene DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit oben erwähnter Sonde bei 68°C hybridisiert. Die entstandenen Hybridisierungssignale zeigten, dass die Behandlung mit *Pst*I und *Kpn*I geeignete DNA-Fragmente für eine Klonierung lieferte.

Die Klonierung des Gens erfolgte nach dem ‚shot-gun‘-Prinzip, wobei die gesamte mit *Pst*I bzw. *Kpn*I geschnittene genomische DNA in den Vektor pBBR1MCS ligiert wurde. Der Ligationsansatz wurde in elektrokompetente *E. coli* KAM3-Zellen transformiert. KAM3 ist ein *E. coli* TG1-Derivat, das eine Mutation in dem Multidrug-Efflux-Protein AcrAB trägt (Morita et al. 1998). KAM3 ist deshalb deutlich sensibler gegenüber einer Vielzahl Antibiotika und toxischer Substanzen als der Wildtyp-Stamm TG1.

Morita et al. (1998) zeigten, dass durch das Multidrug-Efflux-Protein NorM aus *E. coli* und *Vibrio parahaemolyticus* eine Norfloxacin-Resistenz vermittelt wird. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des in der vorliegenden Arbeit in *E. amylovora* identifizierten Gens besitzt Sequenzähnlichkeit zu diesem Protein, so dass für die Selektion der transformierten *E. coli* KAM3-Zellen Norfloxacin verwendet wurde. Die so erzeugten Norfloxacin-resistenten Transformanten enthielten Plasmide mit Insert-Größen von 4,4 kb (*Pst*I-Fragmente) bzw.

6 kb (*KpnI*-Fragment). PCR- und Southernblot-Analyse zeigte, dass die entsprechenden Inserts das *norM*-ähnliche Gen enthielten. Weitere Untersuchungen wurden mit dem Plasmid pBBR.mde6 (4,4 kb *PstI*-Insert) durchgeführt (Abb. 11).

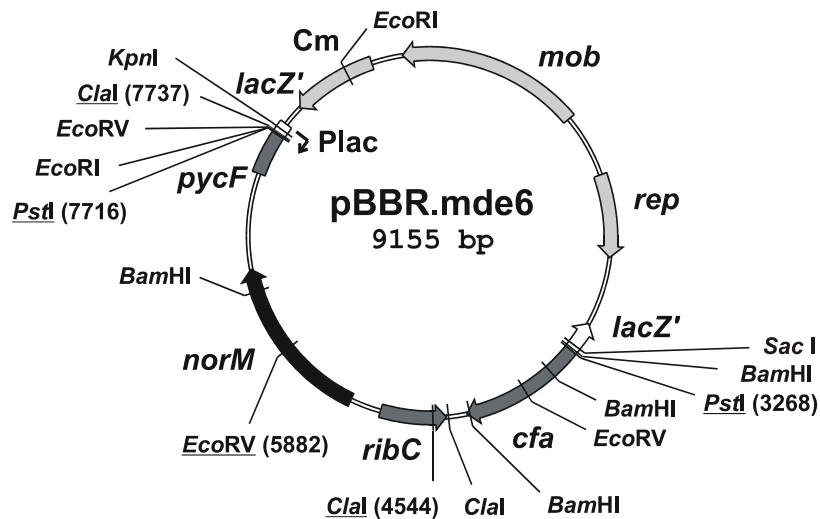


Abb. 11. Schematische Darstellung des Plasmids pBBR.mde6. Das *norM*-Gen kodiert für ein integrales Membranprotein und *ribC* für eine Riboflavinsynthase. Sowohl das für eine Cylopropanfettsäuresynthase kodierende *cfa*-Gen als auch das für die Pyruvatkinase I kodierende *pycF* sind unvollständig auf dem Insert enthalten. Cm, Chloramphenicol-Resistenz; *lacZ'*, Amino-Terminus der β -Galactosidase; *mob*, Mobilitätsfunktion; P_{lac} , Promotorregion von *lacZ'*; *rep*, Replikationsursprung. Die Positionen der Schnittstellen wichtiger Restriktionsenzyme sind in Klammern angegeben.

4.2.2 Analyse der Nukleotidsequenz des Inserts von pBBR.mde6

Für die Sequenzierung beider Stränge des in pBBR.mde6 inserierten 4,4 kb-*PstI*-Fragments aus *E. amylovora* wurde das Insert mit *BamHI*, *FspI* oder *BstXI* geschnitten. Fragmentgrößen bis 2 kb wurden in pBluescript II SK subkloniert und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sequenziert. Durch nachfolgendes Primerwalking wurden fehlende Sequenzen ergänzt, so dass die Nukleotidsequenz des gesamten 4,4 kb-*PstI*-Fragments ermittelt werden konnte.

Durch Sequenzanalysen mit dem Computerprogramm Vector NTI (InforMax, North Bethesda, USA) wurden zwei vollständige ‚open reading frames‘ (ORFs) und zwei trunkierte Gene identifiziert. Die Größe des ersten ORF umfasst 1371 bp und die des zweiten 537 bp. ORF 1 kodiert für ein potientes Protein aus 457 Aminosäureresten mit einer berechneten molekulare Masse von 49,2 kDa.

Datenbankvergleiche unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) zeigten, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF 1 signifikante Ähnlichkeit zu

Transport-Proteinen der ‚multidrug and toxic compound extrusion‘ (MATE)-Familie besitzt (Brown et al., 1999). Die genaue physiologische Funktion der meisten in Tab. 9 aufgelisteten integralen Membranproteinen dieser Familie ist ungeklärt und kann nur aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zu bisher charakterisierten Transportern vorhergesagt werden. Hohe Sequenzidentität des abgeleiteten Genprodukts aus *E. amylovora* wurde zu den physiologisch untersuchten Transportern NorM aus *E. coli* und *V. parahaemolyticus*, sowie VcmA aus *V. cholerae* festgestellt (Morita et al., 1998; Huda et al., 2001). Sie sind in der Lage, strukturell verschiedenartige Antibiotika und toxische Substanzen aus der Zelle zu schleusen. Der aus *E. amylovora* identifizierte ORF 1 wurde mit *norM* (Norfloxacin resistance) und das kodierte Protein mit NorM bezeichnet.

Tab. 9. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *norM*-Gens aus *E. amylovora* mit Transportproteinen der MATE-Familie.

Protein	Funktion	Organismus	Pos.¹ %	Idnt.² %	Länge³ (AS)
YdhE	unbekannt	<i>Salmonella typhimurium</i>	86	74	457
YPO2392	unbekannt	<i>Yersinia pestis</i>	88	73	457
NorM	Export von Norfloxacin, Ciprofloxacin, Acriflavin, Kanamycin, Streptomycin	<i>Escherichia coli</i>	87	73	457
NorM	Export von Norfloxacin, Ciprofloxacin, Ethidiumbromid, Kanamycin, Streptomycin	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	74	55	456
VcmA	Export von Norfloxacin, Ciprofloxacin, Ethidiumbromid, Kanamycin, Streptomycin, DAPI, Daunomycin	<i>Vibrio cholerae</i>	71	52	457
NorM	unbekannt	<i>Pasteurella multocida</i>	72	51	464
NorM	unbekannt	<i>Haemophilus influenzae</i>	66	45	464
NorM1	unbekannt	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62	45	477
NorM	unbekannt	<i>Bacillus subtilis</i>	57	37	452
NorM	unbekannt	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	53	37	458
NorM	unbekannt	<i>Neisseria meningitidis</i>	53	33	458

NorM	unbekannt	<i>Xyllela fastidiosa</i>	54	34	469
AGR_C_3941	unbekannt	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49	30	465
ERC1	Ethionin Resistenz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45	22	617
ALF5	Export von Norfloxacin, Ciprofloxacin, Ethidiumbromid	<i>Arabidopsis thaliana</i>	43	23	477
DinF	Induktion bei DNA-Schädigung	<i>Escherichia coli</i>	37	20	459

¹ ähnliche Aminosäurereste; ² identische Aminosäurereste; ³ Länge des verglichenen Aminosäuresequenzbereichs

Anhand von Sequenzanalysen begründeten Brown et al. (1999) die MATE-Familie, die sekundäre Transportsystem aus Eukaryoten, Archaeobakterien und Eubakterien beinhaltet. NorM besitzt, wie alle Mitglieder dieser Familie, basierend auf einer Hydrophobizitäts-Analyse mit dem Computer-Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/service/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001; Moller et al. 2001) 12 hydrophobe, potentiell membranspannende Domänen. Diese Domänen umfassen jeweils etwa 20 Aminosäurereste (Abb. 12).

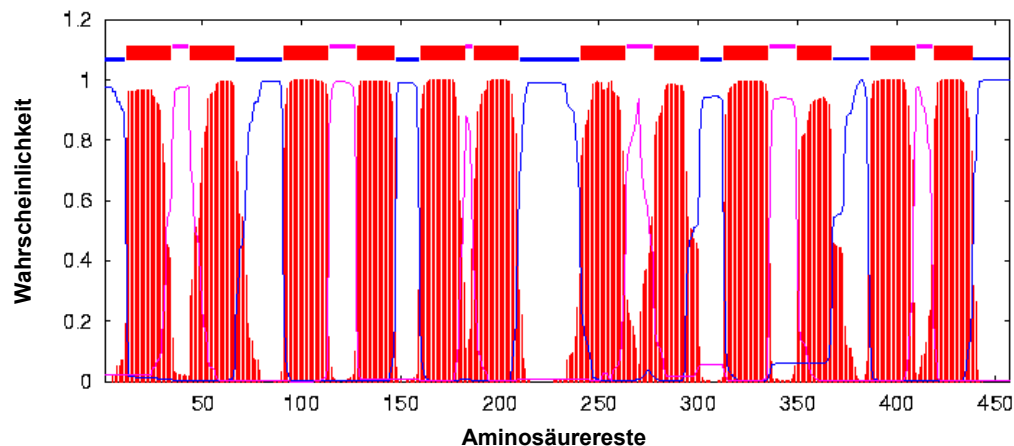


Abb. 12. Hydrophobizitäts-Blot des NorM-Transportproteins aus *E. amylovora* durch das Programm TMHMM erstellt. Auf der x-Achse ist die Anzahl der Aminosäurereste angegeben und auf der y-Achse ist die Wahrscheinlichkeit aufgetragen, mit der Bereiche des Proteins die Zytoplasmamembran durchspannen. rot, transmembranale Domäne; blau, zytoplasmatischer Loop; pink, periplasmatischer Loop.

Die Anwendung der ‚positive-inside-rule‘ nach von Heijne (1992) lässt vermuten, dass sowohl der Carboxy- als auch der N-Terminus des Proteins in das Zytoplasma ragen. Aus dem Topologiemodell kann angenommen werden, dass die 12 membranspannenden Domänen durch Duplikation von 6 α -Helices im Verlauf der Evolution entstanden sind.

Phylogenetischen Analysen zufolge lassen sich die Transportproteine der MATE-Familie in 3 Unterfamilien gliedern (Brown et al., 1999). Unterfamilie 1 umfaßt die Multidrug-Efflux-Proteine von *E. coli*, *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* sowie eine Reihe funktionell nicht-charakterisierter Proteine (Abb. 13). Dieser Gruppe gehört ebenfalls NorM aus *E. amylovora* an. Inwieweit dessen Substratspektrum mit den bereits untersuchten Transportern übereinstimmt, wurde in nachfolgenden Experimenten überprüft. Unterfamilie 2 enthält DinF aus *E. coli* und verwandte Proteine aus Eu- und Archaeobakterien. Die genaue Wirkungsweise der DinF-Proteine ist bisher ungeklärt (Walker, 1995). Lediglich eine erhöhte Genexpression durch DNA-schädigende Agentien, wie UV-C-Strahlung, wurde beschrieben (Kenyon & Walker, 1980). Bei VmrA handelt es sich als einzigen Vertreter dieser Unterfamilie um ein Multidrug-Efflux-Protein (Chen et al., 2002). Unterfamilie 3 setzt sich exklusiv aus eukaryotischen Proteinen zusammen. Darunter befindet sich ECR1, ein Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*, das eine Resistenz gegenüber Ethionin vermittelt (Shiomi et al., 1991). Im *Arabidopsis thaliana*-Genom sind bisher 56 MATE-Proteine identifiziert worden. Nur ein Bruchteil dieser wurde bislang funktionell untersucht, wie beispielsweise das Toxin-transportierende Protein ALF5 der Wurzelepidermis (Diener et al., 2001).

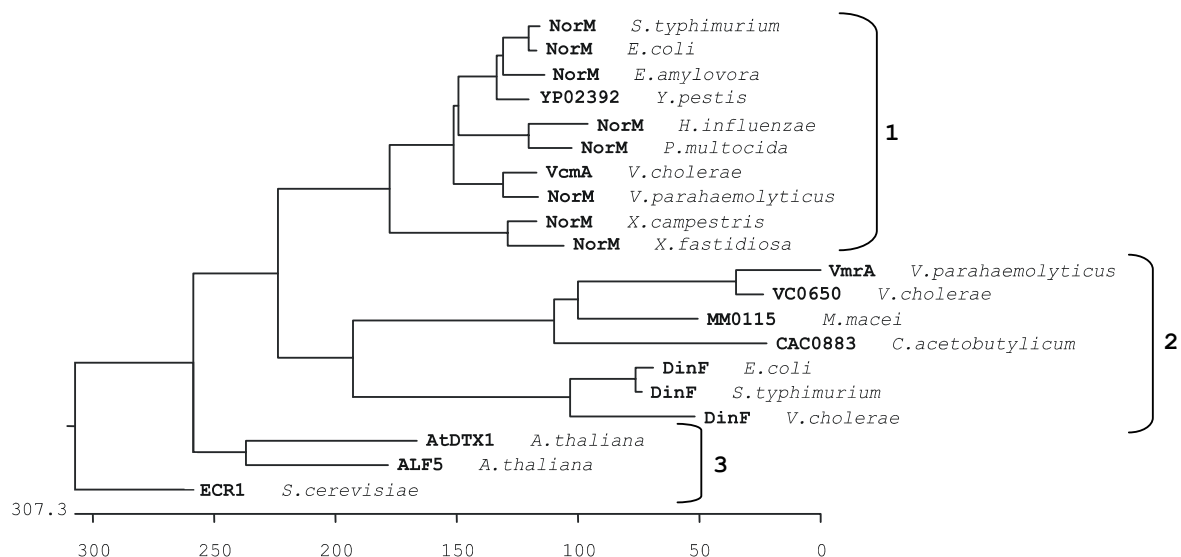


Abb. 13. Phylogenetischer Vergleich von Proteinen, die Ähnlichkeiten zu NorM aus *E. amylovora* aufweisen. Die 3 Unterfamilien der MATE-Familie wurden markiert und numeriert. Die Verzweigungspunkte repräsentieren die mit dem Programm DNA-STAR (Lasergene, USA) berechneten Distanzkoeffizienten. Die Zahlen am unteren Ende des Dendrogramms geben die Anzahl der veränderten Ereignisse wider. Auf der Skala von 0 bis 308 bedeutet der Wert von 0 völlige Übereinstimmung.



Auf dem Insert des Plasmids pBBR.mde6 befindet sich ein weiterer offener Leserahmen, dessen Transkription divergent von *norM* erfolgt (Abb. 15). Das Genprodukt des 566 bp umfassenden Leserahmens besitzt 75% Identität zu einer Riboflavinsynthase aus *E. coli* (Eberhardt et al., 1996). Des weiteren enthält das Insert von pBBR.mde6 einen trunkierten ORF, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz zu 75% mit einer Cyclopropanfettsäuresynthase aus *E. coli* identisch ist (Wang et al., 1992). Stromabwärts von *norM* befindet sich in *E. amylovora* eine Region von etwa 700 bp, in der keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen gefunden werden konnten. Im Anschluss daran folgt eine Nukleotidsequenz, deren abgeleitetes Protein 84% Identität mit Pyruvatkinase I aus *E. coli* aufweist (Ohara et al., 1989).

Bei Vertretern der *Enterobacteriaceae*, die ein *norM*-ähnliches Gen besitzen, ist die Anordnung der Gene stromaufwärts von *norM* konserviert (Abb. 15). Dagegen ist die Region zwischen *norM* und *pykF* sehr variabel. Dafür könnte die Anwesenheit von zwei Valin-tRNA-Sequenzen verantwortlich sein. Aufgrund ihrer konservierten Bereiche, sind tRNA-Gene häufig an sequenzspezifischen Rekombinationsprozessen beteiligt, die zum horizontalen Gentransfer beitragen (Reiter et al. 1989; Williams, 2002). Dabei werden die konservierten Sequenzen der tRNA-Gene im Chromosom von Rekombinasen erkannt und DNA-Abschnitte integriert oder deletiert.

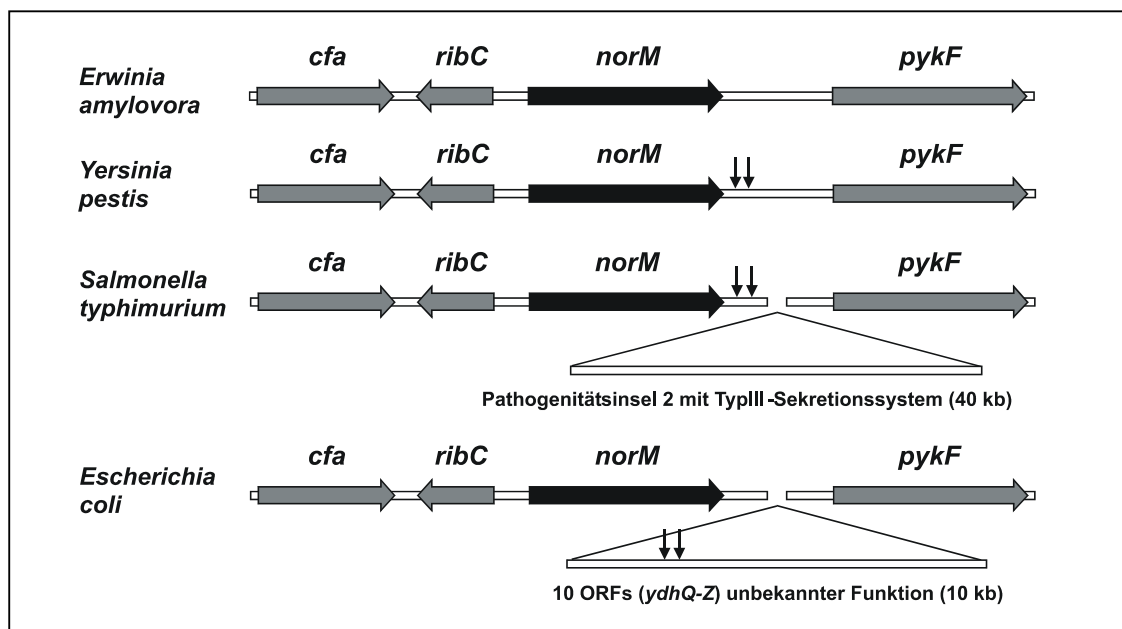


Abb. 15. Anordnung der Gene in der Umgebung von *norM* in Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die vertikalen Pfeile weisen auf die Position zweier Valin-tRNA-Sequenzen hin. Das *norM*-Gen kodiert für ein Transportprotein, *ribC* für eine Riboflavinsynthase, *cfa* für eine Cyclopropanfettsäuresynthase, *pykF* für die Pyruvatkinase I.

Bei *Yersinia pestis* tritt nach den tRNA-Sequenzen eine intergene Region von etwa 1000 bp ohne Ähnlichkeiten zu Datenbankeinträgen auf. *Salmonella typhimurium* hat wahrscheinlich durch Integration in dieser Region die 40 kb umfassende Pathogenitätsinsel 2 erworben (Hansen-Wester & Hensel, 2001; Shea et al., 1996). Bei *E. coli* sind 10 offene Leserahmen unbekannter Funktion ermittelt worden. Bei *E. amylovora* konnte keine tRNA-Sequenz ermittelt werden, was möglicherweise auf Deletionsereignisse zurückzuführen ist.

4.2.3 Klonierung von *acrAB* aus *E. amylovora*

Basierend auf der Nukleotid-Sequenz von *acrB* aus *E. coli* wurde das Primer-Paar *acrB_Ec_fwd1/acrB_Ec_rev1* für eine PCR-Reaktion abgeleitet. Die PCR wurde mit genomischer DNA von *E. coli* TG1 durchgeführt. Das entstandene 1,8 kb-PCR-Produkt diente der Sondenherstellung für eine Southernblot-Analyse. Mit Hilfe dieser Analyse sollte geklärt werden, welche Restriktionsenzyme genomische DNA aus *E. amylovora* so schneiden, dass ein DNA-Fragment entsteht, welches das zu klonierenden Gen vollständig enthält. Dafür wurde die genomische DNA in getrennten Reaktionen mit *ApaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SacII*, *SalI*, *SmaI*, *SpeI* und *XbaI* behandelt. Die geschnittene DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit der *E. coli-acrB*-Sonde bei 50°C hybridisiert. Die entstandenen Hybridisierungssignale zeigten, dass die Behandlung mit *ClaI*, *BamHI*, *HindIII* und *SacI* geeignete DNA-Fragmente für eine Klonierung lieferten.

Die Klonierung des Gens erfolgte nach dem ‚shot-gun‘-Prinzip, wobei die geschnittene genomische DNA in den Vektor pBBR1MCS ligiert wurde. Der Ligationsansatz wurde in elektrokompente *E. coli* KAM3-Zellen transformiert. Nishino & Yamaguchi (2001) zeigten, dass durch AcrB in *E. coli* eine Resistenz gegenüber Methylenblau und Kristallviolett vermittelt wird. Für die Selektion der transformierten *E. coli* KAM3-Zellen wurden 50 µg/ml Methylenblau und 5 µg/ml Kristallviolett verwendet. Die gegenüber diesen Substanzen resistenten Transformanten, die Plasmide mit Insert-Größen von etwa 8,5 kb enthielten (*SacI*-Fragment), wurden nachfolgend untersucht. Partielle Nukleotidsequenzierungen, die von der Firma MWG-Biotech (Ebersbach) vorgenommen wurden, zeigten, dass die Inserts ein *acrB*-ähnliches Gen enthielten. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde das Plasmid pBBR.acr2 verwendet (Abb. 16).

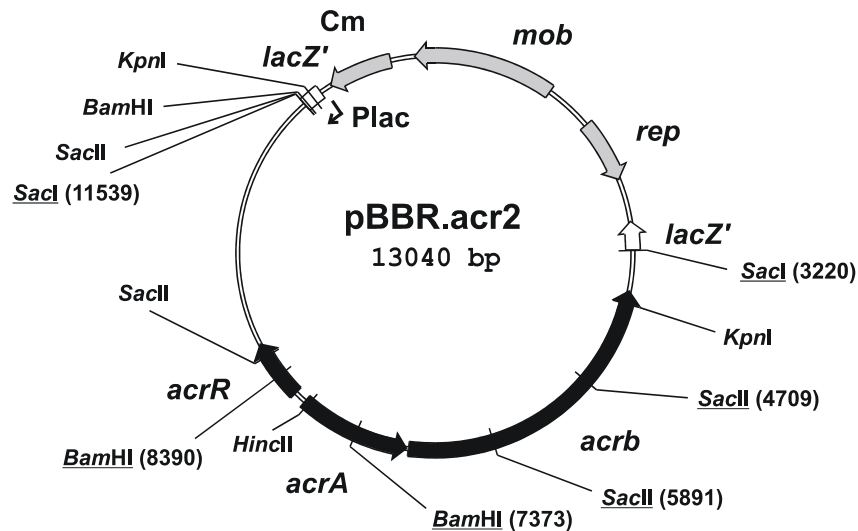


Abb. 16. Schematische Darstellung des Plasmids pBBR.acr2. Das *acrB*-Gen kodiert für ein integrales Membranprotein, *acrA* für ein Lipoprotein, *acrR* für einen Repressor. Cm, Chloramphenicol-Resistenz; *lacZ'*, Amino-Terminus der β -Galactosidase; *mob*, Mobilitätsfunktion; P_{lac} , Promotorregion von *lacZ'*; *rep*, Replikationsursprung. Die Positionen der Restriktionsschnittstellen wichtiger Enzyme sind in Klammern angegeben.

4.2.4 Analyse der Nukleotidsequenz des Inserts von pBBR.acr2

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz des Inserts von Plasmid pBBR.acr2 wurde das 'template generation system' (TGS, Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. In einer *in vitro* Transposition inseriert dabei ein artifizielles Mu-Transposon (Entranceposon) zufällig an eine beliebige Stelle der Plasmid-DNA. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Transposase MuA. Durch die Entranceposon-Insertion entstehen Primer-Bindestellen, die zur Sequenzierung verwendet werden können.

Nach Erzeugung der TGS-Klone erfolgte die Kartierung der Entranceposon-Insertion im Plasmid durch Kolonie-PCR. Das Entranceposon enthält zwei identische Bindestellen für den Primer MuEnd, und das Plasmid enthält die Primerbindestellen für pUC Fwd und pUC Rev, so dass die DNA-Fragmentgröße zu beiden Seiten des Entranceposons ermittelt werden konnte. Die TGS-Klone wurden entsprechend ihrer PCR-Amplifikatgrößen geordnet und für die Sequenzierung diejenigen ausgewählt, die sich in Ihrer Größe um etwa 600 bp voneinander unterschieden (Abb. 17).

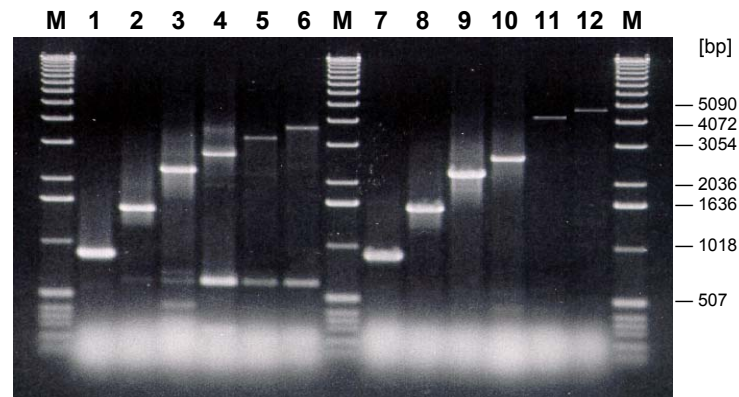


Abb. 17. PCR-Amplifikate aus TGS-Klonen, die das Plasmid pBBR.acr2 mit verschiedenen Entranceposon-Insertionen enthalten. In Spalte 1-6 erfolgte die PCR-Reaktion mit dem Primerpaar MuEnd/pUC Fwd und in Spalte 7-12 mit dem Primerpaar MuEnd/pUC Rev. 1, pTGS1/5; 2, pTGS2/36; 3, pTGS1/12; 4, pTGS1/7; 5, pTGS2/44; 6, pTGS1/39; 7, pTGS1/1; 8, pTGS2/23; 9, pTGS2/13; 10, pTGS2/30; 11, pTGS2/33; 12, pTGS2/10.

Die Nukleotidsequenz des gesamten 8,5 kb-großen *SacI*-Inserts von pBBR.acr2 wurde ermittelt und drei vollständige ORFs nach Analyse des Computerprogramms Vector NTI (InforMax, North Bethesda, USA) ermittelt. Die Größe des ersten ORF umfasst 636 bp, die des zweiten 1191 bp und die des dritten 3147 bp. ORF 1 kodiert für ein potentielles Protein mit 212 Aminosäureresten (berechnete molekulare Masse von 24,2 kDa).

Datenbankvergleiche zeigten, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz von ORF 1 signifikante Ähnlichkeit zu regulatorischen Proteinen hat, die als Repressoren bei der Transkriptionskontrolle wirken. Alle in Tab. 10 aufgelisteten Proteine gehören der TetR-Familie mit einem Molekulargewicht von 21-25 kDa an (Aramaki et al., 1995).

Tab. 10. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *acrR*-Gens aus *E. amylovora* mit Repressoren der TetR-Familie

Protein	Funktion	Organismus	Pos. ¹ (%)	Idnt. ² (%)	Länge ² (AS)
AcrR	Repressor von <i>acrAB</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	78	71	217
AcrR	Repressor von <i>acrAB</i>	<i>Escherichia coli</i>	78	62	215
AcrR	Repressor von <i>acrAB</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	76	60	216
AcrR	Repressor von <i>acrAB</i>	<i>Yersinia pestis</i>	77	59	218
AcrR	Repressor von <i>acrAB</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	78	59	216
TtgR	Repressor von <i>tigABC</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	58	44	210
EnvR	Repressor von <i>envCD</i> (<i>acrEF</i>)	<i>Escherichia coli</i>	58	38	220
AcrR	Repressor von <i>acrAB</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	53	38	219

MtrR	Repressor von <i>mtrCDE</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	51	30	210
TetR	Repressor der Tet-Resistenz auf Plasmiden	<i>Escherichia coli</i>	49	29	217
AmrR	Repressor von <i>amrAB</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	48	28	187
IfeR	Repressor von <i>ifeAB</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45	27	207

¹ ähnliche Aminosäurereste; ² identische Aminosäurereste; ³ Länge des verglichenen Aminosäuresequenzbereichs

Die DNA-Bindung dieser Proteine erfolgt durch ein ‚helix-turn-helix‘(HTH)-Motiv. Ähnlichkeiten von 50-70% wurden zu Repressoren von Genen gefunden, die für Multidrug-Efflux-Transporter der ‚resistance-nodulation-cell division‘ (RND)-Familie kodieren. Von diesen Repressoren wurden AcrR aus *E. coli*, TtgR aus *Pseudomonas putida* und MtrR aus *Neisseria gonorrhoeae* näher charakterisiert (Ma et al., 1996; Duque et al., 2001; Lucas et al., 1997). Aufgrund der signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu AcrR-Proteinen der Enterobakterien wurde der aus *E. amylovora* identifizierte ORF 1 mit *acrR* (Acriflavin resistance) und das kodierte Protein mit AcrR bezeichnet.

Aus einer PROSITE-Datenbank-Suche (<http://www.expasy.org/prosite/>) (Bucher & Bairoch, 1994; Falquet et al., 2002) ging hervor, dass sich das für die TetR-Familie typische Motiv G-[LIVMFYS]-x(2,3)-[TS]-[LIVMT]-x(2)-[LIVM]-x(5)-[LIVQS]-[STAGENQH]-x-[GPAR]-x-[LIVMMF]-[FYST]-x-[HFY]-[FV]-x-[DNST]-K-x(2)-[LIVM] in der AcrR-Sequenz aus *E. amylovora* im Bereich der Aminosäuren G₂₈ bis einschließlich L₅₈ befindet. Dieses Motiv ist im N-Terminus aller Vertreter dieser Familie konserviert und umfasst das für die DNA-Bindung verantwortliche HTH-Motiv (Abb. 18). Der DNA-Bindedomäne schließt sich der nicht-konservierte Carboxy-Terminus an, an dem die Liganden-Bindung und die Dimerisierung erfolgt.

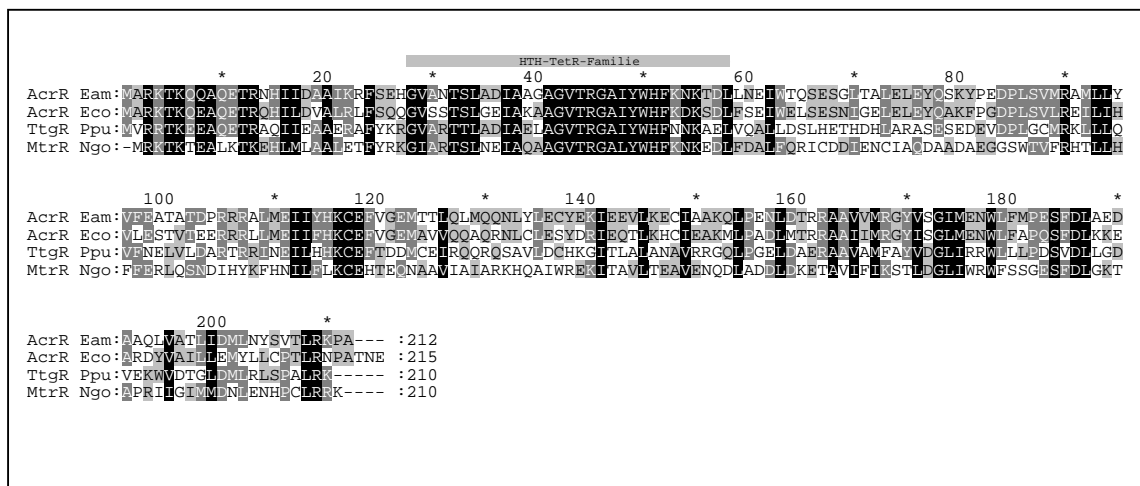


Abb. 18. Sequenzvergleich von AcrR aus *E. amylovora* mit verwandten Proteinen. Schattierungen zeigen die Übereinstimmung der chemischen Eigenschaften der Aminosäurereste: ■, 100%; ■, >80%; ■, >60%; ■, <60%. Im N-Terminus befindet sich die DNA-Bindedomäne mit dem ‚helix-turn-helix‘ (HTH)-Motiv. Der innerhalb der TetR-Regulator-Familie konservierten Sequenzbereich wurde markiert. Der C-Terminus enthält nicht konservierte Sequenzabschnitte. Das Alignment wurde mit dem Programm AlignX (InforMax, North Bethesda, USA) erstellt. Eam, *E. amylovora*; Eco, *E. coli*; Ppu, *P. putida*; Ngo, *N. gonorrhoeae*.

Die beiden anderen identifizierten ORFs des Inserts von Plasmid pBBR.acr2 sind in entgegengesetzter Richtung zu AcrR orientiert. ORF 2 kodiert für ein potientes Protein mit 397 Aminosäureresten und einer berechneten molekulare Masse von 42,3 kDa. Datenbankvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu periplasmatischen Proteinen, die der ‚membrane-fusion-protein‘ (MFP)-Familie angehören (Dinh et al., 1994). Zusammen mit Proteinen der inneren und äußeren Membran ermöglichen sie in Gram-negativen Bakterien den Transport von Substanzen aus dem Zytoplasma ins umgebende Medium. Die Transportproteine der inneren Membran, mit denen MFPs interagieren, können 3 unterschiedlichen Familien zugeordnet werden, und zwar der ‚ATP-binding cassette‘-Familie, der ‚major facilitator‘-Familie und der RND-Familie. Ähnlichkeiten von 50-75% der abgeleiteten Aminosäuresequenz des ORF 2 wurden zu MFPs gefunden, die mit den Transportern der RND-Familie eine funktionelle Einheit bilden (Tseng et al., 1999). Die Gene dieser MFPs sind mit den für die Transporter kodierenden Genen in einem Operon organisiert und unterliegen einer gemeinsamen Regulation. Alle in Tab. 11 erfassten Transportsysteme vermitteln einen Multidrug-Efflux und spielen eine Rolle bei Resistenzmechanismen der Zelle. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten wurde der aus *E. amylovora* identifizierte ORF 2 mit *acrA* und das kodierte Protein mit AcrA bezeichnet.

Tab. 11. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *acrA*-Gens aus *E. amylovora* mit periplasmatischen Proteinen der ‚membrane-fusion-protein‘ (MFP)-Familie

Protein	Funktion	Organismus	Pos.¹ %	Idnt.² %	Länge³ (AS)
AcrA	MFP, Interaktion mit AcrB	<i>Enterobacter aerogenes</i>	77	67	399
AcrA	MFP, Interaktion mit AcrB	<i>Salmonella typhimurium</i>	76	65	397
AcrA	MFP, Interaktion mit AcrB	<i>Escherichia coli</i>	76	65	397
AcrA	MFP, Interaktion mit AcrB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	75	65	398
AcrA	MFP, Interaktion mit AcrB	<i>Yersinia pestis</i>	75	64	395
AcrE (EnvC)	MFP, Interaktion mit AcrF (EnvD)	<i>Escherichia coli</i>	71	53	385
MexA	MFP, Interaktion mit MexB- OprM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65	52	383
TtgA	MFP, Interaktion mit TtgBC	<i>Pseudomonas putida</i>	65	50	384
YhiU	MFP, Interaktion mit YhiV	<i>Escherichia coli</i>	63	47	385
AcrA	MFP, Interaktion mit AcrB	<i>Ralstonia solanacearum</i>	60	46	398
MtrC	MFP, Interaktion mit MtrDE	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	56	39	412
AmrA	MFP, Interaktion mit AmrB	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	53	36	399
IfeA	MFP, Interaktion mit IfeB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52	35	384

¹ ähnliche Aminosäurereste; ² identische Aminosäurereste; ³ Länge des verglichenen Aminosäuresequenzbereichs

AcrA aus *E. amylovora* und verwandte Proteine sind Lipoproteine und werden mit einer N-terminalen Signalpeptid-Sequenz synthetisiert, die nach dem Transport ins Periplasma durch die Signalpeptidase II entfernt wird (Hayashi & Wu, 1990). Signalpeptid-Sequenzen konnten mit dem Computer-Programm SignalPV2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>) (Nielsen et al., 1997; 1999) vorhergesagt werden. Dementsprechend befindet sich bei AcrA aus *E. amylovora* die Signalpeptidase-Schnittstelle zwischen den Aminosäureresten Ala₂₄ und Cys₂₅ (Abb. 19). Die Signalpeptidase schneidet stromabwärts des Cystein-Restes an dem ein Diacylglycerol mit einer Palmitinsäure gebunden ist (Avila-Sakar et al., 2001). Mit Hilfe dieses Lipids wird das Protein in der inneren Membran verankert.

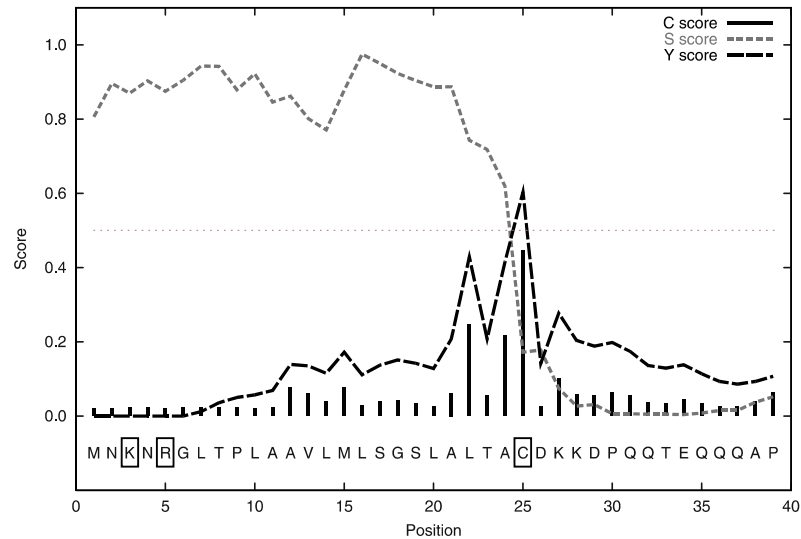


Abb. 19. Postulierte Signalpeptid-Spaltstelle für AcrA aus *E. amylovora*. Für die N-terminalen Aminosäuren wurden die C-, S- und Y-Werte ermittelt. Der C-Wert ist eine Bewertung der Sequenz anhand von Datenbanken, die optimiert sind, Spaltstellen von anderen Sequenzpositionen zu unterscheiden. Er ist direkt nach der Spaltstelle hoch. Der S-Wert ist eine Bewertung der Sequenz anhand von Datenbanken, die optimiert sind, Signalpeptide von Nicht-Signalpeptiden zu unterscheiden. Er ist an allen Positionen vor einer Spaltstelle hoch und fällt nach einer Spaltstelle ab. Der Y-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit einer vorhandenen Spaltstelle basierend auf der Kombination von S- und C-Wert an. Das Präprotein von AcrA aus *E. amylovora* besitzt ein 24 Aminosäure umfassendes Signalpeptid, das vor dem Cystein-Rest abgespalten wird. Typisch für prokaryotische Lipoproteine ist das Auftreten von K und R innerhalb der ersten 7 Aminosäuren. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>).

Bei den mit AcrA-verwandten Proteinen ist die etwa 20 Aminosäure umfassende Signalpeptid-Sequenz nicht konserviert, allerdings besitzen sie die für die Signalpeptidase typische Erkennungssequenz {DERK}(6)-[LIVMFWSTAG](2)-[LIVMFYSTAGCQ]-[AGS]-C (Abb. 20). Aus Computer-Analysen der Topologie der MFP-Familie von Dinh et al. (1994) ist bekannt, dass der Signalpeptid-Sequenz eine konservierte hydrophobe Region von etwa 60 Aminosäuren folgt, die mit den Proteinen der inneren Membran wechselwirkt. Es schließt sich ein nicht-konservierter, aus α -Helices bestehender Bereich an. Aufgrund seiner Hydrophilie kann dieser Bereich das Periplasma durchspannen. Der hydrophobe Carboxy-Terminus enthält dagegen konservierte Sequenzabschnitte und besteht hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen, die typisch sind für Domänen, die mit der äußeren Membran interagieren. AcrA-verwandte Proteine sind aufgrund ihrer Sekundärstruktur in der Lage, mit der inneren und äußeren Membran zu interagieren und dabei den periplasmatischen Raum zu überbrücken (Zgurskaya & Nikaido, 1999; 2000).

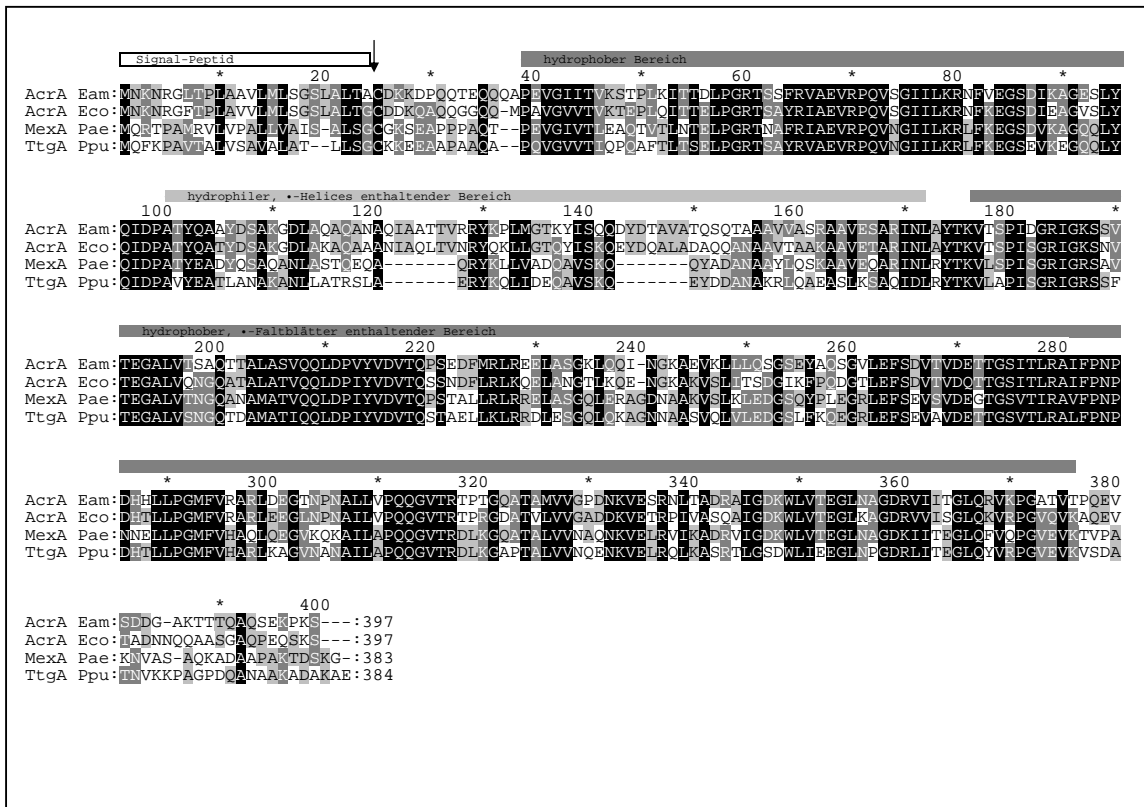


Abb. 20. Sequenzvergleich von AcrA aus *E. amylovora* mit verwandten Proteinen. Schattierungen zeigen die Übereinstimmung der chemischen Eigenschaften der Aminosäurereste: ■, 100%; ■, >80%; ■, >60%; ■, <60%. Im N-Terminus befindet sich das Signalpeptid mit Spaltstelle vor dem Cystein-Rest. Der folgende hydrophobe Bereich interagiert mit innermembranalen Proteinen. Der helikale hydrophile Abschnitt befindet sich im Periplasma. Im hydrophoben Carboxy-terminalen Bereich, der β -Faltblattstrukturen enthält, erfolgt die Wechselwirkung mit der äußeren Membran. Das Alignment wurde mit dem Programm AlignX (InforMax, North Bethesda, USA) erstellt. Eam, *E. amylovora*; Eco, *E. coli*; Pae, *P. aeruginosa*; Ppu, *P. putida*.

Stromabwärts des *acrA*-Gens aus *E. amylovora* befindet sich der dritte ORF des Inserts von Plasmid pBBR.acr2. Dieser kodiert für ein 1048 Aminosäurereste umfassendes potentiell Protein mit einer molekulare Masse von 113,5 kDa. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Datenbankeinträgen zeigten signifikante Ähnlichkeiten mit integralen Membranproteinen der RND-Transporterfamilie (Tseng et al., 1999). Proteine dieser Familie treten sowohl bei Eu- als auch bei Prokaryoten auf und transportieren neben Schwermetallen unterschiedliche Substanzen, wie Sterole, Lipooligosaccharide und Antibiotika. Ähnlichkeiten von 50-80% wurden zu den Vertretern der RND-Familie ermittelt, die als Multidrug-Efflux-Proteine in Gram-negativen Bakterien verschiedene chemische Verbindungen in einem einzigen Energie-gekoppelten Schritt ins Medium schleusen (Tab. 12). Für diesen Prozess benötigen sie ein periplasmatisches Protein, wie z. B. AcrA, und

ein als ‚outer membrane factor‘ (OMF) bezeichnetes Porin-ähnliches Protein der äußeren Membran (Paulsen et al., 1997). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zu den Acr-Transportsystemen, wurde der aus *E. amylovora* identifizierte dritte ORF mit *acrB* und das entsprechend abgeleitete Protein mit AcrB bezeichnet.

Tab. 12. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *acrB*-Gens aus *E. amylovora* mit Multidrug-Efflux-Transportern der ‚resistance-nodulation-cell division‘ (RND)-Familie

Protein	Transportfunktion	Organismus	Pos. ¹ (%)	Idnt. ² (%)	Länge ³ (AS)
AcrB	Antibiotika, SDS	<i>Enterobacter aerogenes</i>	88	80	1048
AcrB	Antibiotika, Farbstoffe, Detergenzien	<i>Salmonella typhimurium</i>	87	79	1049
AcrB	unbekannt	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	87	79	1048
AcrB	Antibiotika, Farbstoffe, Detergentien	<i>Escherichia coli</i>	87	79	1049
AcrB	unbekannt	<i>Yersinia pestis</i>	86	79	1050
AcrF	Antibiotika, Farbstoffe, Detergentien	<i>Escherichia coli</i>	84	74	1034
YhiV	Antibiotika, Farbstoffe, Detergentien	<i>Escherichia coli</i>	79	68	1037
MexB	Antibiotika, Farbstoffe, Detergenzien, Homoserinlactone	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79	66	1046
TtgB	Toluen und anderen aromatischen Kohlenwasserstoffe, Antibiotika	<i>Pseudomonas putida</i>	78	64	1050
AcrB	unbekannt	<i>Ralstonia solanacearum</i>	75	62	1053
IfeB	Isoflavonoide	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66	50	1046
AmrB	Aminoglycoside, Makrolide	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	65	49	1043
MtrD	Antibiotika, Detergentien, Lipide, antimikrobielle Peptide	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	64	48	1067

¹ ähnliche Aminosäurereste; ² identische Aminosäurereste; ³ Länge des verglichenen Aminosäuresequenzbereichs

Einer Hydrophobizitätsanalyse mit dem Computerprogramm HMMTOP 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html>) (Tusnády & Simon, 1998; 2001) zufolge besitzt AcrB aus *E. amylovora* 12 für RND-Proteine typische, membranspannende α -Helices, die jeweils etwa 20 Aminosäurereste umfassen. Zwischen α -Helix 1 und 2 sowie zwischen α -Helix 7 und 8 befinden sich jeweils aus etwa 260 Aminosäuren bestehende hydrophile Domänen, die ins Periplasma ragen (Abb. 21). Aus dem Topologiemodell kann postuliert werden, dass die 12 membranspannenden Domänen aus einer internen Genduplikation (Saier et al., 1994) hervorgegangen sind. Für die Proteine der RND-Familie wurden konservierte Sequenzmotive gefunden, die im Bereich der zwischen α -Helix 1 und 2 befindlichen periplasmatischen Domäne und in Bereichen der α -Helices 2, 4 und 10 liegen (Putman et al., 2000; Tseng et al., 1999).

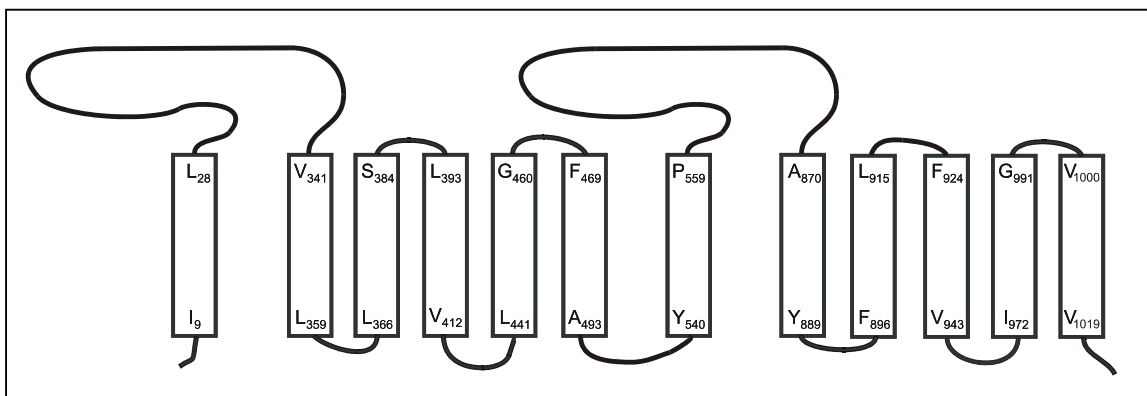


Abb. 21. Topologievorhersage für AcrB aus *E. amylovora* erstellt durch das Programm HMMTOP2.0. 12 α -Helices bilden die membranbindende Domäne und zwei hydrophile Domänen ragen ins Periplasma.

4.3 Heterologe Expression von *norM* und *acrB* in *E. coli* KAM3

Nachfolgend wurde das Substratspektrum von NorM und AcrB aus *E. amylovora* bestimmt. Es sollte geklärt werden, ob dieselben Verbindungen wie die von sequenzähnlichen Proteinen transportiert werden können.

Für die Untersuchungen wurden die für NorM und AcrB kodierenden Gene heterolog in *E. coli* KAM3 exprimiert. In den anschließenden Reihenverdünnungstests (MHKs) wurden die minimalen Hemmkonzentrationen unterschiedlicher Substanzen gegen *E. coli* KAM3 mit denen gegen komplementierte *E. coli* KAM3-Zellen verglichen (Abb. 22). Die MHK gibt die kleinste Konzentration einer Substanz an, die notwendig ist, um das Wachstum des Testorganismus vollständig zu hemmen.

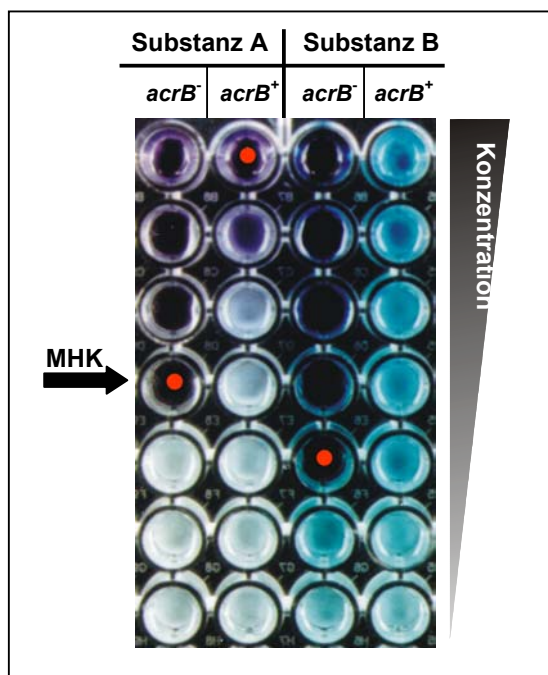


Abb. 22. Bestimmung von MHKs in Mikrotiterplatten-Assays. Die Testsubstanz wurde seriell 1:2 in Müller-Hinton-Boullion verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Bakterienzellen. Die Hemmung des Wachstums wurde nach 24 h Inkubation bewertet. Exemplarisch ist *E. coli* KAM3 (*acrB*⁻) und dessen Komplementation mit pBBR.acr2 (*acrB*⁺) dargestellt.

Es wurden Substanzen überprüft, die als Substrate für Multidrug-Efflux Transporter der MATE- und RND-Familie bekannt waren (Poole, 2000a; 2001; van Bambeke et al., 2000). Dazu gehören Antibiotika, wie Norfloxacin als Vertreter der Chinolone, Ampicillin als β -Lactam, Kanamycin als Aminoglycosid sowie Tetracyclin. Des weiteren wurden Farbstoffe, wie Methylenblau, Kristallviolett sowie Ethidiumbromid, und Pflanzeninhaltsstoffe, wie das Isochinolin-Alkaloid Berberin aus *Berberis*- und *Mahonia*-Pflanzenarten, und Detergenzien wie SDS eingesetzt.

Zusätzlich wurden phenolische Verbindungen getestet, die als Phytoalexine der Apfelpflanze eine Rolle bei der Abwehr gegen Mikroorganismen spielen (Treutter, 2001; Harborne, 1999). Darunter befanden sich Protocatechonsäure, Chlorogensäure, das Flavanol (+)-Catechin, das Flavonol Quercetin, das Flavon Naringenin und das Dihydrochalcon Phloretin. Einige dieser Verbindungen liegen konstitutiv in der Pflanze als Glykoside vor, wie z. B. Quercetin und Phloretin, und werden bei Pathogenbefall in das antimikrobiell wirksame Aglykon umgewandelt. Genistein, ein typisches Phytoalexin aus Leguminosen, wurde ebenfalls überprüft.

Für die Testdurchführung wurden *E. coli*-Wildtyp TG1 und die AcrAB-Mutante *E. coli* KAM3 eingesetzt. Letztere wurde mit dem Vektor pBBR1MCS und mit Plasmiden transformiert, die die für die Transportproteine kodierenden Gene *acrAB* bzw. *norM* enthielten (Tab. 13). Das Plasmid pBBR.norM enthält ein 3,2 kb-Insert mit *norM* aus *E. amylovora*, das divergent zum Lac-Promotor des Vektors durch seinen nativen Promotor transkribiert wird. Das Insert stammt aus pBBR.mde6, aus dem das 3,2 kb-Fragment mit dem

Restriktionsenzym *ClaI* entfernt und anschließend in pBBR1MCS subkloniert wurde. Durch diesen Klonierungsschritt wurde das von *norM* stromaufwärts gelegene *ribC*-Gen so trunziert, dass dessen Funktion nachfolgende Experimente nicht beeinflussen kann. Zum Vergleich des Substratspektrums von *norM* aus *E. amylovora* wurde *norM* aus *E. coli* im Test mitgeführt.

Tab. 13. Vergleich der MHKs verschiedener Substanzen bei *E. coli* TG1 und *E. coli* KAM3. KAM3 wurde mit *norM* und *acrRAB* aus *E. amylovora* heterolog komplementiert.

Substanz	MHK (µg/ml)				
	TG1	KAM3 pBBR1MCS	KAM3 pBBR.norM-Ec ¹	KAM3 pBBR.norM ²	KAM3 pBBR.acr2 ³
Nalidixinsäure	6,3	1,6	1,6	1,6	3,1
Norfloxacine	0,1	0,02	0,2	0,1	0,05
Ciprofloxacine	0,02	0,006	0,02	0,01	0,006
Ampicillin	3,1	1,6	3,1	3,1	3,1
Carbenicillin	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
Kanamycin	1,6	0,8	1,6	1,6	1,6
Spectinomycin	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Tetracycline	0,8	0,2	0,2	0,2	0,2
Rifampicin	6,3	3,1	6,3	3,1	1,6
Kristallviolett	12,5	0,2	0,2	0,8	6,3
Methylenblau	500	3,1	6,3	6,3	50
Ethidiumbromid	125	4	15,6	15,6	62,5
Berberin	>1000	62,5	125	250	500
Phloretin	>1000	62,5	125	125	500
Phloridzin	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Quercetin	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Naringenin	>1000	250	250	250	500
(+) -Catechin	>5000	2500	2500	2500	2500
Chlorogensäure	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
Protocatechonsäure	5000	5000	5000	5000	5000
Genistein	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
Dimethoxychalcon	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
Salicylsäure	5000	5000	5000	5000	5000
SDS	>5000	156	>5000	>5000	>5000

¹ *norM* aus *E. coli*, ² *norM* aus *E. amylovora*, ³ *acrAB* aus *E. amylovora*

Es zeigte sich, dass *acrAB* in *E. coli* KAM3 gegen verschiedene Substanze eine Resistenz vermittelte: Phloretin (8fach), Berberin (8fach), Ethidiumbromid (15fach), Methylenblau (16fach), Kristallviolett (30fach) und SDS (mindestens 30fach). Durch *norM* aus *E. amylovora* wurde KAM3 signifikant resistenter gegen Berberin (4fach), Ethidiumbromid (4fach), Kristallviolett (4fach), Norfloxacin (5fach) und SDS (mindestens 30fach). Eine 2fache Resistenz, die beide Transporter z. B. gegen Ampicillin und Kanamycin vermittelten, wurde als nichtsignifikant betrachtet. Unterschiede im Substratspektrum von NorM aus *E. amylovora* und NorM aus *E. coli* traten nicht auf. Allerdings erwies sich *E. coli* KAM3 durch pBBR.norM-Ec resistenter gegenüber Norfloxacin und Ciprofloxacin als durch pBBR.norM. Generell vermittelte *acrAB* eine höhere Resistenz als *norM* aus *E. amylovora*, abgesehen von Norfloxacin und Ciprofloxacin, die bevorzugt von NorM transportiert wurden. Von den getesteten Pflanzeninhaltsstoffen kommen als Substrate nur Berberin und Phloretin für AcrAB in Frage und Berberin für NorM aus *E. amylovora* und *E. coli*. Die Substrate, die in diesem Testsystem für NorM und AcrAB gefunden wurden, stimmen mit denen von verwandten Transportern überein. Zusätzlich wurde für AcrAB das Apfel-Phytoalexin Phloretin als neues Substrat identifiziert.

4.4 Verbreitung von *norM* und *acrB* in *E. amylovora*- und verwandten Bakterienstämmen

Die Verbreitung von *norM* und *acrB* wurde an 19 verschiedenen *E. amylovora*-Stämmen und 18 Stämmen verwandter pflanzenassoziierter Bakterienarten untersucht. Dafür wurde genomische DNA aus dem jeweiligen Stamm präpariert und einer PCR- bzw. Southernblot-Analyse unterzogen.

Die PCR-Analyse ergab, dass alle 19 *E. amylovora*-Stämme sowohl *norM* als auch *acrB* besaßen (Tab. 14). Die Größe der PCR-Amplifikate wich trotz unterschiedlicher geographischer Herkunft und trotz verschiedener Wirtspflanzen in keinem Fall von der des *E. amylovora*-Stammes GSPB 1189 ab. Mit genomischer DNA aus mit *E. amylovora* nah verwandten anderen Bakterienarten ergab der PCR-Test kein positives Signal. Deshalb wurden diese Stämme anschliessend mittels Southernblot-Analyse untersucht. Nach Spaltung der betreffenden genomischen DNAs mit der Restriktionsendonuklease *ClaI* und elektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer 1000 bp-großen *norM*-Sonde und einer 3000 bp-großen *acrB*-Sonde bei einer Temperatur von 50°C (niedrige Stringenz). Hybridisierungssignale konnten bei allen getesteten Stämmen nachgewiesen werden (Tab. 14).

Tab. 14. Nachweis von *norM* und *acrB* bei Stämmen von *E. amylovora* und verwandten Arten mittels PCR- und Southernblot-Analyse

Art	Stamm	PCR-Analyse		Southernblot-Analyse	
		<i>norM</i>	<i>acrB</i>	<i>norM</i>	<i>acrB</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	GSPB 1189	+	+	+	+
	GSPB 1190, 1263, 1654, 1655, 1656, 1657, 1658, 1659, 1839	+	+	n.g. ¹	n.g.
	Ea 0, Ea 1, Ea 1/79, Ea 8, Ea 11, Ea 266	+	+	n.g.	n.g.
	PD 576, PD 579, IL6	+	+	n.g.	n.g.
<i>E. pyrifoliae</i>	Ep1/96	-	-	+	+
<i>E. rhapontici</i>	DSM 4484, GSPB 454	-	-	+	+
<i>E. persicinus</i>	CFBP 3622, GSPB 2443	-	-	+	+
<i>E. mallotivora</i>	CFBP 2503	-	-	+	+
<i>E. psidii</i>	CFBP 3627	-	-	+	+
<i>E. herbicola</i> pv. <i>gypsophilae</i>	824-1	-	-	+	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	2b/89, 52c/90	-	-	+	+
<i>P. stewartii</i>	SW2, SS 104	-	-	+	+
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	AC 4150, 3937	-	-	+	+
<i>P. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	90	-	-	+	+
<i>Brenneria quercina</i>	CFBP 3617	-	-	+	+
<i>B. salicis</i>	CFBP 802	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	TG1	-	-	+	+

¹ nicht getestet

Die Hybridisierung der genomischen DNA mit der *norM*-Sonde ergab bei allen Stämmen eine einzelne Bande (Abb. 23). Es kann angenommen werden, dass sich keine weiteren Gene mit hoher Identität zu *norM* in den betreffenden Genomen befinden. Bei der Hybridisierung mit der *acrB*-Sonde dagegen traten mehrere Signale auf (Abb. 23). Einerseits könnte die Ursache darin liegen, dass das *acrB*-Gen mancher Bakterienstämme eine *ClaI*-Schnittstelle enthält. Andererseits sind von *E. coli* mindestens vier *acrB*-ähnliche Gene bekannt (Nishino

& Yamaguchi, 2001; Sulavik et al., 2001), so dass es sich bei diesen Signalen um weitere Transporter-kodierende Gene mit Ähnlichkeit zu *acrB* handeln könnte.

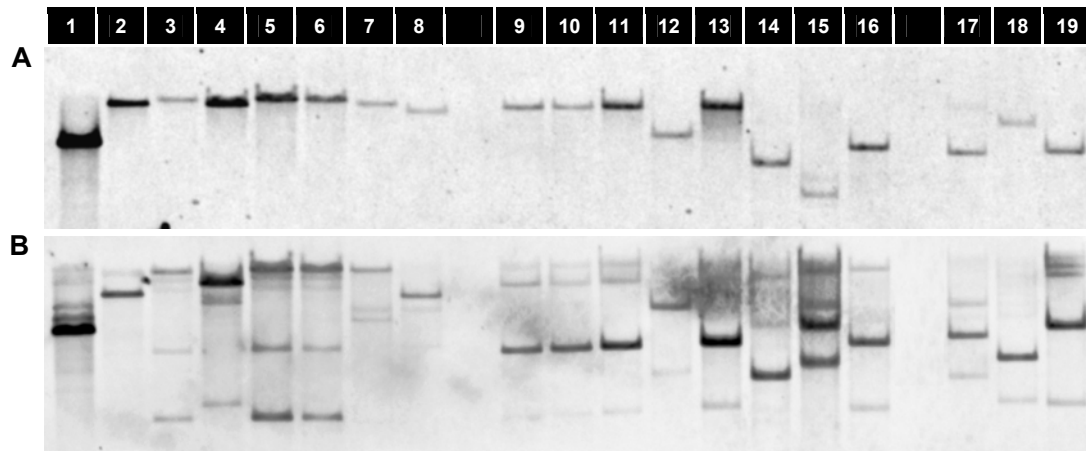


Abb. 23. Southernblot-Analyse zur Verbreitung des *norM*- und *acrB*-Gens bei Bakterienarten aus der Verwandtschaft von *E. amylovora*. (A) Verwendung der *norM*-Sonde zur Hybridisierung mit *Cla*I-geschnittener genomischer DNA. (B) Verwendung der *acrB*-Sonde zur Hybridisierung mit *Cla*I-geschnittener genomischer DNA. Spuren: 1, *E. amylovora* GSPB 1189; 2, *E. pyrifoliae* Ep1/96; 3, *E. rhapontici* GSPB 454; 4, *E. rhapontici* DSM 4484; 5, *E. persicinus* CFBP 3622; 6, *E. persicinus* GSPB 2443; 7, *E. mallotivora* CFBP 2503; 8, *E. psidii* CFBP 3627; 9, *E. herbicola* pv. *gypsophila* 824-1; 10, *P. agglomerans* 2b/89; 11, *P. agglomerans* 52c/90; 12, *P. stewartii* SW2; 13, *P. stewartii* SS104; 14, *P. chrysanthemi* AC4150; 15, *P. chrysanthemi* 3937; 16, *P. carotovora* pv. *carotovora* 90; 17, *B. quercina* CFBP 3617; 18, *B. salicis* CFBP 802; 19, *E. coli* TG1.

4.5 Herstellung von *norM*- und *arcB*-Mutanten von *E. amylovora*

Physiologische Untersuchungen zur Funktion der beiden Multidrug-Efflux-Proteine NorM und AcrAB erfolgten wie nachfolgend dargestellt an Mutanten von *E. amylovora* GSPB 1189, bei denen das entsprechende Gen durch die Integration einer Antibiotika-Resistenzkassette ausgeschaltet wurde. Dabei wurde der Phänotyp der Mutanten mit dem des Wildtyps verglichen.

Die Mutantenerzeugung erfolgte durch Marker-Austausch-Mutagenese. Dafür wurde ein Suizidplasmid verwendet, das einen DNA-Abschnitt des zu mutagenisierende Gens enthielt, in den eine Resistenzkassette eingebaut wurde. Dieses Suizidplasmid ist nicht in der Lage, sich in *E. amylovora* zu replizieren. Durch homologe, sequenzspezifische Rekombination kann die Resistenzkassette in das entsprechende Gen im Chromosom integrieren. Für die Konstruktion der Suizidplasmide wurde der Vektor pCAM140-MCS verwendet. Dieser Vektor ist abgeleitet von dem Plasmid pCAM140 (Wilson et al., 1995), aus dem das Transposon mTn5SS*gusA40* durch die Restriktionsenzyme *Sal*I und *Eco*RI entfernt wurde.

4.5.1 Herstellung von *norM*-Mutanten von *E. amylovora*

Zur Erzeugung eines Suizidplasmids für die Marker-Austausch-Mutagenese wurde zuerst Plasmid pBlue.mde4 konstruiert. Dieses Plasmid enthält ein 3,2 kb-Insert mit *norM* aus *E. amylovora*, das entgegen gesetzt vom Lac-Promotor des Vektors durch seinen nativen Promotor transkribiert wird. Das Insert stammt aus pBBR.mde6, aus dem das 3,2 kb-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Cla*I und *Pst*I entfernt und anschließend in pBluescript II SK subkloniert wurde. Das Plasmid pBlue.mde4 besitzt eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Eco*RV. Diese Schnittstelle befindet sich in der Mitte des *norM*-Gens und wurde für die Insertion einer 2,1 kb Chloramphenicol (Cm)-Resistenzkassette durch ‚blunt-end‘-Ligation genutzt, um Plasmid pBlue.mde4-Cm zu erzeugen. Die Resistenzkassette entstammt dem Plasmid pfd4. Das entstandene 5,4 kb-Fragment wurde aus pBlue.mde4-Cm in die *Cla*I- und *Spe*I-Restriktionsschnittstellen des Vektors pCAM140-MCS inseriert. Das resultierende Plasmid wurde mit pCAM.norM-Cm bezeichnet (Abb. 24).

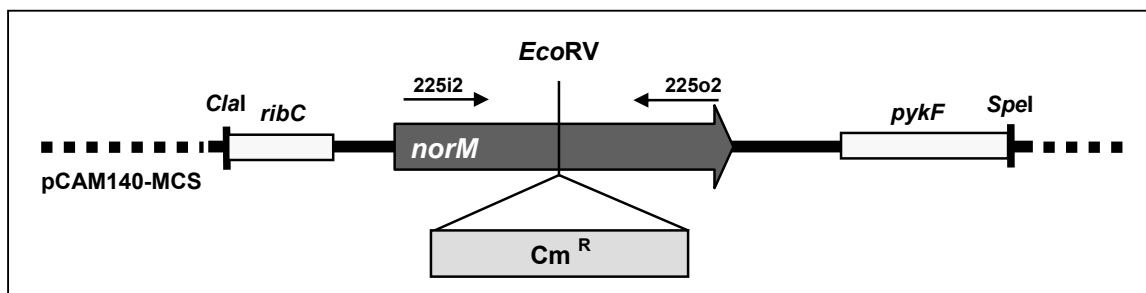


Abb. 24. Konstruktion des Suizidplasmids pCAM.norM-Cm zur Mutagenese von *norM*. Insertion einer 2,1 kb Cm-Resistenzkassette in das *norM*-Gen, das sich auf einem 3,2 kb-Fragment befindet. Die DNA-Region stromaufwärts der Insertionsstelle umfaßt 1,8 kb und stromabwärts 1,3 kb. Der Austausch des *norM*-Gens im Chromosom durch das mutagenisierte Gen erfolgt über ‚double-crossover‘ während einer sequenzspezifische Rekombination. Zwei für die Überprüfung der resultierenden Mutanten genutzte Primer (225i2/225o2) binden am 5‘- bzw. 3‘-Ende von *norM* und sind in Form von Pfeilen dargestellt.

Die Marker-Austausch-Mutagenese erfolgte durch Elektroporation des Plasmids pCAM.norM-Cm in kompetente *E. amylovora*-Zellen. Die Überprüfung der Klone erfolgte auf AMM2-Agarplatten, denen Cm oder Ampicillin (Amp) zugesetzt wurden. Bei Klonen, die ein gutes Wachstum in Anwesenheit von Cm und kein Wachstum mit Amp zeigten, wurde die stattgefundenene Rekombination mittels PCR- und Southernblot-Analyse überprüft. Mit 43 auf diese Weise gewonnenen Klonen wurde eine Kolonie-PCR mit dem Primerpaar 225i2/225o2 durchgeführt (Abb. 25A). Die Primer binden am 5‘- bzw. 3‘-Ende von *norM*.

Dementsprechend ergab das Wildtyp-Gen ein Amplifikat von 1 kb und das mutierte Gen ein Amplifikat von 3,1 kb, was auf ein erfolgtes ‚double crossover‘ hinweist. Bei Klonen, bei denen lediglich ein ‚single crossover‘ stattfand, wurden beide PCR-Produktgrößen amplifiziert. Diese Klone enthalten das intakte *norM*-Gen und das gesamte ins Genom inserierte Plasmid pCAM.norM-Cm.

Klone, bei denen mittels PCR ein mutiertes *norM*-Gen nachgewiesen werden konnte, wurden nachfolgend in einer Southernblot-Analyse überprüft. Genomische DNA dieser Klone wurde mit *Cla*I gespalten und bei 68°C mit einer *norM*-Sonde und einer pCAM140-MCS-Sonde hybridisiert. Bei 7 von insgesamt 10 getesteten Klonen wurde ein um 2 kb vergrößertes Signal im Vergleich zur Wildtyp-DNA detektiert, was der Größe der Resistenzkassette entspricht (Abb. 25B). Des weiteren hybridisierte die DNA diese Klone nicht mit der pCAM140-MCS-Sonde (nicht dargestellt). Dies beweist, dass eine Insertion der Resistenzkassette durch ‚double crossover‘ in das *norM*-Gen stattgefunden hat und somit entsprechende Mutanten erzeugt wurden, die für weitere physiologische Untersuchungen eingesetzt werden konnten. Die DNA der Klone 10, 24 und 36 hybridisierte mit der pCAM140-MCS-Sonde, so dass hier zusätzlich Insertionen des gesamten pCAM.norM-Cm ins Genom erfolgten. Diese Klone wurden verworfen.

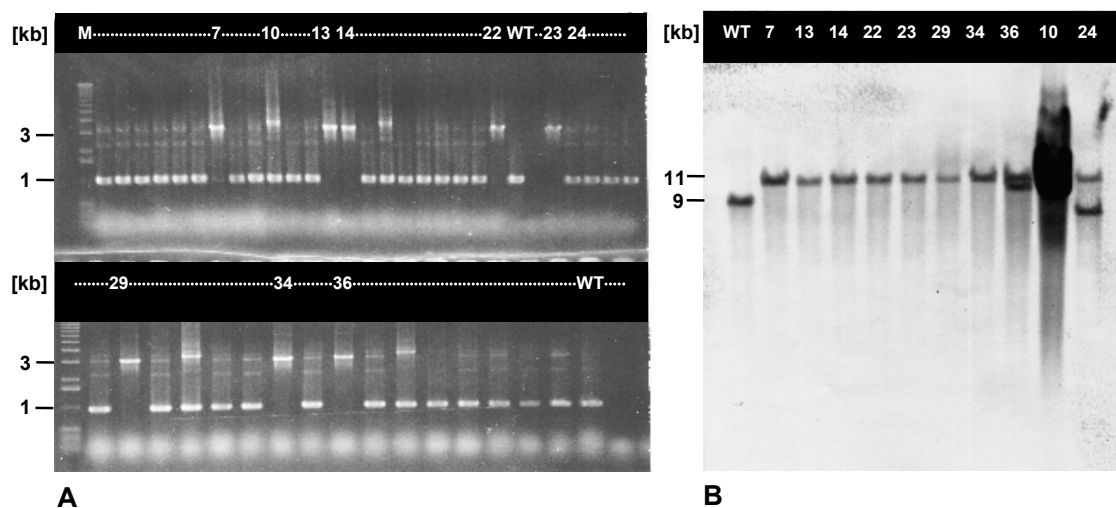


Abb. 25. Bestätigung des Genotyps der *norM*-Mutanten von *E. amylovora*. (A) Kolonie-PCR unter Verwendung des Primerpaares 225i2/225o2. Spuren: M, 1-kb-Leiter; 7, 13, 14, 22, 23, 29, 34, 36, Amplifikate aus Klonen, die das mutagenisierte *norM*-Gen enthalten; 10, Amplifikat aus Klon, bei dem ein ‚single crossover‘ stattfand; 24, Amplifikat aus Klon, der das intakte *norM*-Gen enthält; WT, Amplifikat des intakten *norM*-Gens aus *E. amylovora*. (B) Southernblot-Analyse mit *Cla*I-gespaltenener genomischer DNA und *norM*-Sonde. Spuren: WT, genomische DNA aus *E. amylovora*; 7, 13, 14, 22, 23, 29, 34, 36, genomische DNA aus Klonen, die ein 3,1 kb-PCR-Amplifikat besaßen; 10, genomische DNA aus Klon, der ein 1 kb- und 3,1 kb-PCR-Amplifikat besaß; 24, genomische DNA aus Klon, der nur ein 1 kb-PCR-Amplifikat besaß.

4.5.2 Herstellung von *acrB*-Mutanten von *E. amylovora*

Auf einem 4,4 kb umfassendes *SacI/BamHI*-Inserts des Plasmids pBBR.*acrB5* befindet sich das vollständige 3,1 kb-große *acrB*-Gen. Das Plasmid entstand durch Subklonierung des Inserts aus pBBR.*acr2* in pBBR1MCS. Unter Ausnutzung von zwei innerhalb des *acrB*-Gens gelegenen *SacII*-Restriktionsschnittstellen wurde die auf einem 1,7 bp *SphI*-Fragment vorliegende Kanamycin (Km)-Resistenzkassette aus pMKm durch ‚blunt-end‘-Ligation inseriert. Die zwischen den *SacII*-Erkennungsstellen gelegene Sequenz von 1000 bp wurde dabei deletiert. Das entstandene 5,1 kb-Insert wurde aus pBBR.*acrB5*-Km durch die Restriktionsenzyme *SacI* und *BamHI* entfernt und mit Klenow-Polymerase I behandelt. Anschließend wurde das Fragment in die *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors pCAM140-MCS inseriert (Abb. 26).

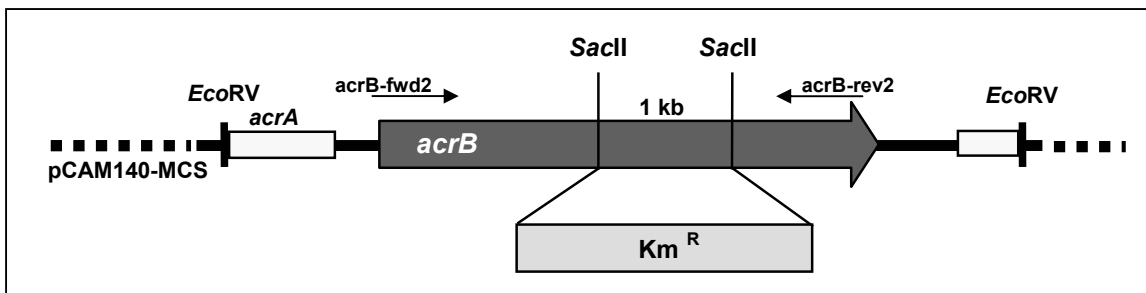


Abb. 26. Konstruktion des Suizidplasmids pCAM.*acrB*-Km zur Mutagenese von *acrB*. Insertion einer 1,7 kb Km-Resistenzkassette in das *norM*-Gen, das sich auf einem 3,2 kb-Fragment befindet. Die DNA-Region stromaufwärts der Insertionsstelle umfaßt 2 kb und stromabwärts 1,4 kb. Der Austausch des *acrB*-Gens im Chromosom durch das mutagenisierte Gen erfolgt über ‚double-crossover‘ während einer sequenzspezifische Rekombination. Die Primer binden zu Beginn und am Ende von *acrB* und sind als Pfeile dargestellt.

Das entstandene Konstrukt wurde mit pCAM.*acrB*-Km bezeichnet und für die Marker-Austausch-Mutagenese verwendet. Die Plasmid-DNA wurde über Elektroporation in *E. amylovora*-Zellen eingeschleust. Die Überprüfung der Klone erfolgte auf AMM2-Agarplatten, dem Km oder Amp zugegeben wurde. Bei 14 Klonen, die ein gutes Wachstum in Anwesenheit von Km und ein eingeschränktes mit Amp zeigten, wurde die stattgefundenene Rekombination mittels PCR- und Southernblot-Analyse untersucht. Mit dem Primerpaar *acrB*-fwd2/*acrB*-rev2 wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Primer binden zu Beginn und am Ende des *acrB*-Gens, so dass das intakte Gen ein Amplifikat von 3 kb ergibt. Bei Klonen, die das mutierte Gen enthielten, sollte ein Amplifikat von 3,7 kb entstehen. Allerdings konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden, das auf eine Integration der

Resistenzkassette in das chromosomale *acrB*-Gen zurückzuführen sein könnte. Lediglich die Entstehung einer unspezifische 2 kb-Bande wurde bei diesen Klonen beobachtet.

Für eine nachfolgende Kontrolle im Southernblot wurden 4 Klonen ausgewählt, die kein PCR-Produkt mehr lieferten und davon genomische DNA präpariert. Diese wurde mit *Bam*HI geschnitten und mit einer *acrB*-, einer Km- und einer pCAM140-MCS-Sonde bei 68°C hybridisiert. Die Hybridisierung mit der *acrB*-Sonde ergab bei allen Klonen ein um etwa 500 bp vergrößertes Signal im Vergleich zur Wildtyp-DNA, was einer Vergrößerung des *acrB*-Gens durch die Insertion der Resistenzkassette entspricht (Abb. 27). Des weiteren konnte bei allen Klonen ein Signal durch die Hybridisierung mit der Km-Sonde detektiert werden. Zusätzlich hybridisierte die DNA dieser Klone in keinem Fall mit der pCAM140-MCS-Sonde. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei allen 4 Klonen eine Insertion der Resistenzkassette durch ‚double crossover‘ in das *acrB*-Gen stattgefunden hat und entsprechende Mutanten erzeugt wurden, die für weitere Untersuchungen verwendet werden konnten.

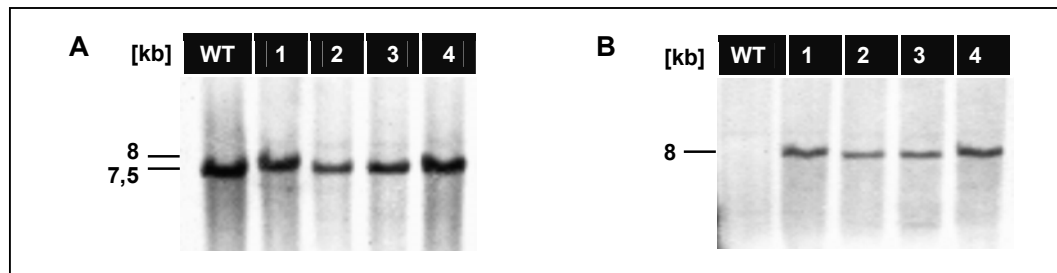


Abb. 27. Bestätigung des Genotyps der *acrB*-Mutanten durch Southernblot-Analyse. (A) Hybridisierung *Cla*I-geschnittener genomischer DNA mit der *acrB*-Sonde. Spuren: WT, genomische DNA aus *E. amylovora*; 1-4, genomische DNA aus Klon 1-4. (B) Hybridisierung *Cla*I-geschnittener genomischer DNA mit der Km-Sonde. Spuren: WT, genomische DNA aus *E. amylovora*; 1-4, genomische DNA aus Klon 1-4.

4.6 Wirkung antimikrobieller Substanzen auf die *norM*- und die *acrB*-Mutante von *E. amylovora*

Zur Charakterisierung des Phänotyps der *norM*- und *acrB*-Mutanten von *E. amylovora* wurde die Wirkung verschiedener Substanzen auf das Wachstum der Stämme im Vergleich zum Wildtyp getestet. Dafür wurde die MHK dieser Verbindungen in AMM2-Medium getestet. Die Untersuchungen wurden bei 18°C und 28°C durchgeführt, da das *norM*-Gen eine temperaturabhängige Expression aufweist. Es wurden Antibiotika, Farbstoffe und Detergenzien überprüft, die bereits in vorangegangenen Tests als Substrate für NorM und das

AcrAB-Transportsystem aus *E. amylovora* identifiziert wurden, sowie pflanzliche Sekundärmetabolite, die bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen.

Es zeigte sich, dass fast alle in Tab. 15 aufgelisteten Verbindungen auf den Wildtyp bei beiden Temperaturen dieselben Wirkungen besaßen. Ausnahmen bildeten Norfloxacin, Ciprofloxacin, Ampicillin und Cabenicillin, die den Wildtyp stärker bei 28°C als bei 18°C hemmten. Die *norM*-Mutante war bei beiden Temperaturen gegenüber den getesteten Substanzen genauso resistent wie der Wildtyp. Im Gegensatz dazu erwies sich die *acrB*-Mutante gegenüber allen aufgeführten Substanzen, mit Ausnahme von Chlorogensäure, Salicylsäure und dem Aminoglykosid Spectinomycin, signifikant sensitiver als der Wildtyp.

Gegen die Wirkung der aufgelisteten Antibiotika, außer Nalidixinsäure, war die *acrB*-Mutante mindestens 8fach sensitiver als der Wildtyp. Gegenüber Nalidixinsäure war die Mutante nur 4fach sensitiver. Die Farbstoffe wirkten mindestens 4fach (Kristallviolett), 40fach (Methylenblau) bzw. 150fach (Ethidiumbromid) stärker hemmend auf die *acrB*-Mutante als auf den Wildtyp. Gegenüber dem Detergenz SDS war die Mutante etwa 60fach anfälliger als der Wildtyp.

Bei den als Phytoalexine aus Rosengewächsen bekannten Verbindungen Phloretin, Quercetin und Naringenin genügten 15-30fach geringere Konzentrationen für eine Wachstumshemmung der *acrB*-Mutante, als für die Hemmung des Wildtyps notwendig waren. Von dem Phytoalexin Genistein aus Leguminosen genügte eine 60fach und von dem Alkaloid Berberin eine 30fach geringere Konzentration. Ein Unterschied in der Hemmung bei 18°C und 28°C konnte bei keiner Substanz gefunden werden, was auf eine Temperaturunabhängigkeit des Transportsystems AcrAB hinweist.

Die Komplementation der *AcrB*-Mutante erfolgte mit dem Plasmid pBBR.acr2, das die Gene für AcrRAB enthält. Dadurch wurde der Mutante gegenüber allen getesteten hemmenden Verbindungen, mit Ausnahme der β -Lactame Ampicillin und Carbenicillin, eine Resistenz vermittelt. Die MHKs der komplementierten Mutante stimmten mit denen des Wildtyps überein. Gegen die β -Lactamen konnte durch die Komplementation keine Resistenz erzeugt werden, so dass diese Verbindungen kein Substrat für AcrAB darstellen.

Tab. 15. Vergleich der minimalen Hemmkonzentration verschiedener Substanzen bei *E. amylovora* und der *norM*- und *acrB*-Mutante.
Der Test wurde in AMM2-Medium bei 18°C und 28°C durchgeführt. Die *acrB*-Mutante wurde mit pBBR.acr2 komplementiert.

Substanz	MHK [$\mu\text{g/ml}$]							
	Wildtyp				<i>acrB</i> -Mutante pBBR1MCS			
	18°C	28°C	18°C	28°C	18°C	28°C	18°C	28°C
Nalidixinsäure	1,6	0,8	1,6	0,8	0,4	0,4	1,6	1,6
Norfloxacin	0,8	0,2	0,8	0,2	0,02	0,02	0,8	0,2
Ciprofloxacin	0,2	0,05	0,2	0,1	0,006	0,006	0,2	0,05
Ampicillin	250	63	250	63	31	6,3	63	16
Carbenicillin	250	63	250	63	16	6,3	16	6,3
Tetracyclin	1,6	1,6	1,6	1,6	0,2	0,2	1,6	1,6
Spectinomycin	100	50	100	50	100	50	100	50
Kristallviolett	1,6	3,1	1,6	3,1	0,4	0,4	1,6	3,1
Methylenblau	>500	>500	>500	>500	12,5	12,5	>500	>500
Phloretin	250	250	250	250	8	16	125	125
Quercetin	>1000	>1000	>1000	>1000	31	31	>1000	>1000
Naringenin	500	500	500	500	31	31	250	250
(+)-Catechin	5000	5000	5000	5000	1250	1250	2500	2500
Chlorogensäure	500	500	500	500	500	500	500	500
Protocatechonsäure	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Genistein	>1000	>1000	>1000	>1000	7,8	16	>1000	>1000
Berberin	>1000	>1000	>1000	>1000	31	16	>1000	>1000
Ethidiumbromid	250	250	250	250	1,6	1,6	250	250
SDS	250	250	250	250	4	4	250	250

4.7 Test von Blattextrakten im Agardiffusionstest

Phytoalexine sind niedermolekulare, antimikrobiell wirksame Verbindungen, die von der pflanzlichen Abwehr bei Pathogenkontakt synthetisiert werden (Somssich & Hahlbrock, 1998). Einige Phytoalexine sind konstitutiv vorhanden. Sie werden als inaktive Vorstufe gespeichert und nach Pathogenbefall oder Gewebeverletzung als aktive Verbindung freigesetzt. (Osbourn, 1996) Phytoalexine, die durch *E. amylovora* bei Vertretern der *Rosaceae*-Familie induziert sind, wurden bisher nicht beschrieben. Aus dieser Pflanzenfamilie sind jedoch verschiedenen konstitutiv-gebildete Flavonoide mit einer antimikrobiellen Wirkung bekannt (Treutter, 2001). Eine Phytoalexin-Induktion wurde an der Interaktion von Apfelpflanzen mit pathogenen Pilzen untersucht, die eine Bildung von Biphenylen und Dibenzofuranen im Apfel verursachten (Borejsza-Wysocki et al., 1999; Kokubun & Harborne, 1995).

Zur Überprüfung der Wirkung phenolischer Verbindungen aus Vertretern der *Rosaceae*-Familie, wurden exemplarisch aus Blättern von Apfel, Birne, Quitte und Weißdorn methanolische Rohextrakte hergestellt. Die Wirkung der Extrakte auf das Wachstum von *E. amylovora* und dessen Transporter-Mutanten wurden im Agardiffusionstest untersucht. Eine Hemmung des Wachstums wurde anhand der Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt (Tab. 16). Es zeigte sich, dass die Extrakte von Quitte und Weißdorn keine antibakterielle Wirkung besaßen. Der Birnenextrakt inhibierte schwach das Wachstum sowohl des Wildtyps als auch der *norM*- bzw. der *acrB*-Mutante. Eine schwache Hemmung der *acrB*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp und *norM*-Mutante konnte bei Klarapfelextrakten beobachtet werden. Dagegen wurde eine signifikante Hemmung der *acrB*-Mutante durch den Extrakt der Blätter der Apfelsorte MM 106VF erzeugt (Abb. 28). Das Wachstum von Wildtyp und *norM*-Mutante hingegen blieb unbeeinflusst. Eine vergleichbare inhibierende Wirkung auf die *acrB*-Mutante zeigte der Extrakt aus Apfelblättern, die zuvor mit *E. amylovora* infiziert wurden. Es kann angenommen werden, dass es dabei um die Wirkung von phenolischen Verbindungen handelt, die konstitutiv in dieser Apfelsorte gebildet werden. Aufgrund der temperaturabhängigen Expression von *norM* erfolgte die Inkubation der Agardiffusionstestplatten bei 18°C und 28°C. Hierbei konnte kein Unterschied in der Hemmwirkung der Extrakte bei einer der beiden Temperaturen festgestellt werden.

Tab. 16. Wachstumshemmung von *E. amylovora* Wildtyp und der *norM*- und *acrB*-Mutante im Agardiffusionstest durch methanolische Extrakte, die aus Blättern von Vertretern der Wirtspflanzen von *E. amylovora* hergestellt wurden. Die Testplatten wurden bei 18°C und 28°C inkubiert.

	Hemmhofdurchmesser [mm]							
	Wildtyp		<i>norM</i> - Mutante		<i>acrB</i> - Mutante		<i>acrB</i> -Mutante pBBR.acr2	
	18°C	28°C	18°C	28°C	18°C	28°C	18°C	28°C
Apfel MM 106VF	0	0	0	0	20	25 (45) ³	0	0
Infiziert¹ (3 d Inkubation)	0	0	0	0	29	27(47)	0	0
Infiziert² (30 d Inkubation)	0	0	0	0	24	24 (45)	0	0
Klarapfel	0	0	0	0	(18)	(15)	0	0
Birne	12	12	12	12	12	12	12	12
Qitte	0	0	0	0	0	0	0	0
Weißdorn	0	0	0	0	0	0	0	0
Spectinomycin	22	25	23	29	24	29	27	29

¹ Apfel MM 106VF infiziert mit *E. amylovora* und Ernte der Blätter nach 3 d (Pflanze ohne sichtbare Symptome)

² Apfel MM 106VF infiziert mit *E. amylovora* und Ernte der Blätter nach 30 d (Pflanze mit deutlichen Symptomen)

³ Klammern geben eine partielle Hemmung des Teststammes an

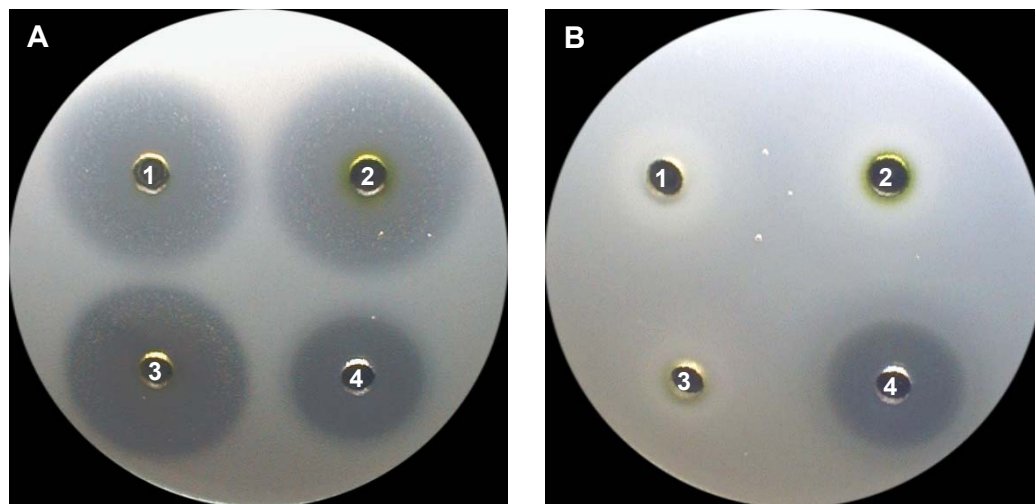


Abb. 28. Agardiffusionstest mit methanolischem Extrakt aus Blättern der Apfelsorte MM 106VF als Testsubstanz. (A) Verwendung der *acrB*-Mutante als Teststamm. (B) Verwendung der mit pBBR.acr2 komplementierten *acrB*-Mutante als Testorganismus. 1, MM 106VF nicht-infiziert; 2, MM 106VF mit *E. amylovora* infiziert und 3 d inkubiert; 3, MM 106VF mit mit *E. amylovora* infiziert und 30 d inkubiert; 4, Spectinomycin 5 mg/ml.

Die Hemmung des Wachstums der *acrB*-Mutante konnte durch die Komplementation dieser Mutante mit dem Plasmid pBBR.*acr2* aufgehoben werden. Durch ein intaktes *acrB*-Gen wurde also eine Resistenz gegenüber Sekundärmetaboliten aus der Apfelsorte MM 106VF vermittelt, so dass dieser Transporter in der Interaktion mit der Pflanze eine wichtige Rolle spielen könnte.

4.8 Hypersensitive Reaktion an Tabak

Zu den pflanzlichen Abwehrmechanismen, die nach Pathogenkontakt beobachtet werden, zählt u.a. die Ausbildung einer lokalen hypersensitiven Reaktion (HR). Dabei entstehen Nekrosen, die das Eindringen und die weitere Ausbreitung eines Pathogens verhindern (Lam et. al., 2001). In einer inkompatiblen Pflanze/Pathogeninteraktion kann ein Pathogenbefall durch diesen Mechanismus abgewendet werden. Die Auslösung einer makroskopisch sichtbaren HR bei Tabak kann zur Überprüfung der Fähigkeit von Pathogenen, eine HR an einer ihrer Nichtwirtspflanze zu erzeugen, herangezogen werden. Für das Feuerbrandpathogen stellt Tabak eine Nichtwirtspflanze dar.

Der Wildtyp von *E. amylovora* sowie seine *acrB*- und *norM*-Mutante wurden in die Blattunterseiten von Tabakpflanzen des Kultivars „Petit Havanna SR1“ injiziert und nach 24 bzw. 48 h auf die Ausbildung einer HR hin untersucht. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten verursachten eine deutliche HR (Abb. 29). Die H₂O-Kontrolle zeigte keine HR.

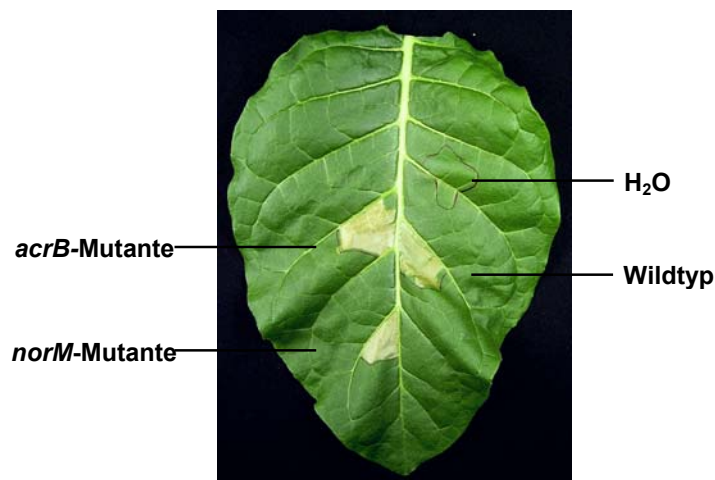


Abb. 29. Ausbildung der hypersensitiven Reaktion (HR) an Tabak hervorgerufen durch den *E. amylovora* Wildtyp und dessen *acrB*- und *norM*-Mutante. Die Adern auf der Blattunterseite von 8 Wochen alten Tabakpflanzen wurden inokuliert und nach 48 h die HR dokumentiert.

In diesem Interaktionssystem ist die Sekretion von Effektorproteinen durch ein Typ III-Proteinsekretionssystem für die HR-Auslösung verantwortlich. In *E. amylovora* – wie auch in anderen Pflanzenpathogenen – ist der Typ III-Sekretionsapparat durch die Gene des *hrp*-Regulons kodiert (Alfano & Collmer, 1997). Da keine Unterschiede in der HR-Ausbildung bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden konnten, ist davon auszugehen, dass durch die hier durchgeführte Mutagenese keine sekundäre bzw. indirekte Beeinträchtigung der Funktion der *hrp*-Genprodukte hervorgerufen wurde.

4.9 Virulenztest der Mutanten an Apfelpflanzen

Vorangegangene Untersuchungen wiesen auf eine mögliche Rolle des AcrAB-Transportsystems bei der Interaktion des Feuerbrandpathogens mit seiner Wirtspflanze Apfel hin. Im folgenden sollte die Virulenz von *E. amylovora* sowie der *norM*- bzw. *acrB*-Mutante *in planta* überprüft werden. Es wurden Apfelunterlagen verwendet, so dass eine genetische Identität des Pflanzenmaterials gewährleistet werden konnte. Die Sorte MM 106VF gilt im allgemeinen als mittelmäßig anfällig gegen Feuerbrand.

Die Inokulation der Bakterien erfolgte an der Triebspitze der Pflanzen durch Anwendung der sogenannten „Prick“-Technik. Dabei wird die Triebspitze mit einer Injektionskanüle durchstoßen. Die so entstandene Wunde dient als künstliche Eintrittsstelle für die Bakterien (Abb. 30). Die Beurteilung der Virulenz erfolgte zum einen durch die Ermittlung der Überlebensrate bei verschiedenen Inokulat-Konzentrationen nach einem Tag Inkubation und zum anderen durch die Beschreibung der Symptomausbildung über einen Zeitraum von 3 Wochen.



Abb. 30. Inokulation von *E. amylovora* und seinen Mutanten in die Spitze eines Triebes der Apfelunterlage MM 106VF durch „Prick“-Technik. Der rote Kreis markiert die Stelle der Verwundung, die als Eintrittspforte für die Bakterien dient.

Zur Untersuchung der Überlebensrate, wurden Suspensionen des Wildtyps sowie der *norM*- bzw. der *acrB*-Mutante mit verschiedenen Lebendzellzahlen in die Triebe inokuliert. Nach 24 h wurden Bakterienzellen re-isoliert und die Anzahl koloniebildender Einheiten bestimmt. Die Daten wurden durch 2 unabhängige Wiederholungen verifiziert. Es zeigte sich, dass von Pflanzen, die mit dem Wildtyp und der *norM*-Mutante inokuliert wurden, je Inokulum dieselbe Anzahl von *E. amylovora*-Zellen re-isoliert werden konnte (Tab. 17). Beide Stämme vermehrten sich dementsprechend im Pflanzengewebe innerhalb von 24 h gleichermaßen. Im Gegensatz dazu konnten von der *acrB*-Mutante bei einem Inokulum von 10^2 bzw. 10^3 cfu/Einstich nach 24 h keine Bakterien aus der Pflanze re-isoliert werden. Es mußten höhere Zellzahlen als Inokulum eingesetzt werden, damit sich eine *in planta*-Population der *acrB*-Mutante entwickeln konnte. Wurden die Pflanzen mit höheren Zellzahlen infiziert, konnte nur etwa 1% des Inokulums re-isoliert werden. Im Gegensatz dazu erreichte der Wildtyp und die *norM*-Mutante Populationen mit einer etwa 10mal höheren Zellzahl verglichen zum eingesetzten Inokulum. Durch das Fehlen des AcrB-Proteins hat die entsprechende Mutante offensichtlich einen notwendigen Abwehrmechanismus verloren. Somit ist die Entwicklung einer *in planta*-Population der *acrB*-Mutante nach der Infektion durch die Abwehr der Pflanze stark beeinträchtigt.

Tab. 17. Bestimmung der Überlebensrate von *E. amylovora*, *norM*- und *acrB*-Mutante. Die Bakterien wurden mit verschiedenen Zellzahlen durch „Prick“-Technik in die Triebspitze der Apfelunterlage MM 106 VF inokuliert und nach 24 h re-isoliert.

Inokulum [cfu/Einstich]	Re-isolation von Bakterienzellen [cfu/cm Stengel]		
	Wildtyp	<i>norM</i> -Mutante	<i>acrB</i> -Mutante
10^2	$6 \times 10^2 \pm 60$	$1,8 \times 10^3 \pm 60$	0
10^3	$4 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^3$	0
10^4	$5 \times 10^5 \pm 6,5 \times 10^3$	$1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^3$	$2,8 \times 10^2 \pm 63$
10^5	$9 \times 10^5 \pm 7,5 \times 10^4$	$8 \times 10^5 \pm 6 \times 10^4$	$4 \times 10^3 \pm 4,2 \times 10^2$
10^6	$1,3 \times 10^6 \pm 5,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$

Für die Beurteilung der Symptomausprägung von Wildtyp, *norM*- und *acrB*-Mutanten, wurden je Stamm 15 Pflanzen infiziert und 3 Wochen lang täglich beobachtet. Bei Wildtyp und *norM*-Mutante traten bei 9 Pflanzen starke Symptome auf, wobei die betroffenen Triebe im Verlaufe der 3 Wochen nekrotisch wurden und abstarben. Im Falle der 6 übrigen Pflanzen konnte eine Infektion verhindert werden und die entsprechenden Triebe entwickelten sich

normal weiter. Durch die *acrB*-Mutante wurden nach 7 Tagen bei 6 Pflanzen Symptome verursacht. Allerdings verlief die Krankheitsentwicklung weniger deutlich. Nur ein Trieb starb vollständig ab. In den übrigen 9 Pflanzen wurden die Infektionen von der pflanzlichen Abwehr deutlich eingedämmt und die betroffenen Apfeltriebe entwickelten sich normal weiter.

4.10 Transkriptionelle Regulation von *acrAB* und *acrR*

Die Expression der Gene von Multidrug-Efflux-Proteinen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Genexpression kann in den verschiedenen Wachstumsphasen, unter bestimmten Stressbedingungen, sowie in Anwesenheit der Substrate verändert sein (Grkovic et al., 2002).

Die transkriptionelle Regulation des *acrR*-Gens und *acrAB*-Operons wurde anhand der Promotoraktivitäten untersucht. Dafür wurde das Reportergen *egfp* eingesetzt, da es auch in Expressionsstudien *in planta* verwendet werden kann. Das promotorlose *egfp* ist auf dem Vektor pBBR.egfp.TIR in entgegengesetzter Richtung des Promotors von *lacZ'* lokalisiert. Aus dem Insert des Plasmids pBBR.acr2 wurde ein die *acrRAB*-Promotorregion enthaltendes etwa 1 kb-umfassendes DNA-Fragment durch die Restriktionsendonuklease *Bam*HI entfernt. Dieses Fragment wurde in die *Bam*HI-Schnittstelle von pBBR.egfp.TIR kloniert und die Orientierung des Inserts durch gleichzeitig Behandlung mit *Hinc*II und *Spe*I überprüft. Plasmide, bei denen das *egfp*-Gen durch die Aktivität des Promotors des *acrAB*-Operons bzw. des *acrR*-Gens transkribiert wird, wurden mit pBBR.egfp.acrA bzw. pBBR.egfp.acrR bezeichnet (Abb. 29). Diese Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. amylovora* transformiert.

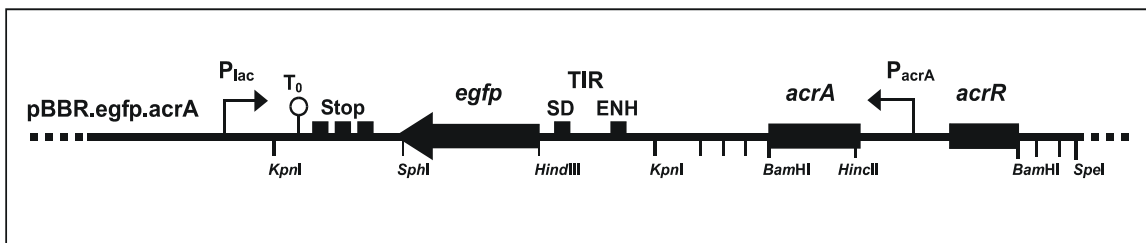


Abb. 31. Transkriptionelle Fusion des Reportergens *egfp* mit *acrA* aus *E. amylovora* auf dem Plasmid pBBR.egfp.acrA. ENH, 'translational enhancer' von Gen 10 des Phagen T7 (Miller & Lindow, 1997); P_{lac}, Promotorregion von *lacZ'*; P_{acrA}, Promotorregion von *acrA*; SD, Shine-Dalgarno-Sequenz; Stop, translationale Stop-Codons in allen 3 Leserahmen; T₀, transkriptioneller Terminator des Phagen λ (Andersen et al., 1998).

Zunächst wurde die Genexpression in Abhängigkeit der Wachstumsphase untersucht. Dafür wurden die Transformanten in AMM2-Medium bei 28°C kultiviert und Zellproben bei verschiedenen ODs gewonnen. Von diesen Zellen wurde die Fluoreszenz des gebildeten EGFPs vermessen. Als Kontrolle wurde das Plasmid pBBR.egfp.lacZ verwendet, bei dem das *egfp*-Gen durch den Promotor von *lacZ'* exprimiert wird. Die Transformanten erreichten alle ähnliche ODs in der Stationärphase (Abb. 32). Hinsichtlich des Wachstums konnte kein Unterschied zum *E. amylovora* Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). Alle Transformanten besaßen eine mindestens 2fach erhöhte *egfp*-Expression in der Stationärphase (Abb. 32). Die höchsten Fluoreszenzwerte wurden durch die Aktivität des Promotors des *lacZ'*-Gens bestimmt. Der Promotor von *acrR* besaß im Vergleich zu dem von *acrAB* während der gesamten Wachstumsphase eine geringere Aktivität. Eine temperaturabhängige Regulation der Promotoren von *acrR* und *acrAB* wurde ebenfalls untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied im Expressionsmuster beider Gene bei 18°C und 28°C ermittelt werden (Daten nicht dargestellt).

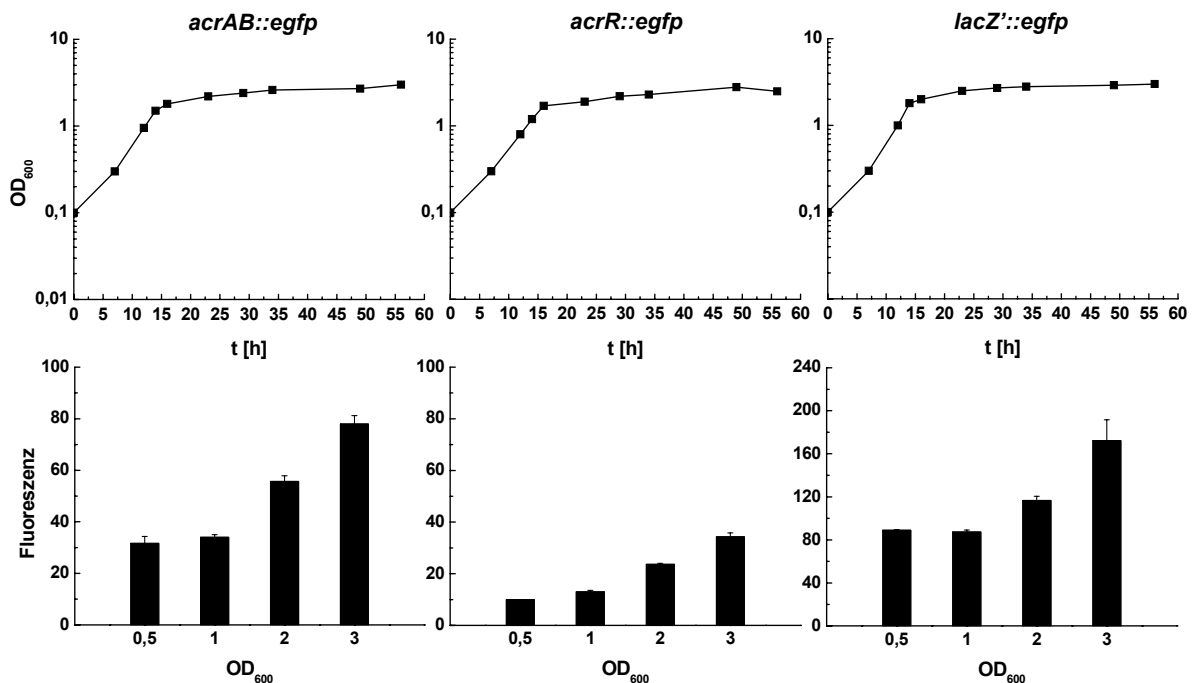


Abb. 32. Bestimmung der Promotoraktivitäten von *acrAB*, *acrR* und *lacZ'* mittels transkriptioneller Fusionen mit dem Reportergen *egfp*. Im Verlauf von Submerskulturen in AMM2-Medium bei 28°C wurden bei den verschiedenen ODs Zellproben gewonnen. Von diesen Proben erfolgte die Fluoreszenzmessung des gebildeten EGFPs. Die Fluoreszenz wurde auf eine OD = 0,1 berechnet.

Anschließend wurde der Einfluß von Substraten auf die Expression des *acrR*-Gens und des *acrAB*-Operons untersucht. Dies erfolgte in Mikrotiterplatten, da sich damit serielle

Verdünnungen der Substanzen herstellen und effizient testen ließen. Die Transformanden wurden der Wirkung von Phloretin, Quercetin, Naringenin, Berberin, Norfloxacin und Kristallviolett ausgesetzt. Für den *acrR*-Promotor konnte eine 2 bis 2,5fache Induktion durch alle getesteten Substrate, mit Ausnahme von Kristallviolett, ermittelt werden (Abb. 33). Jedoch mußten von diesen Substanzen, bis auf Phloretin, so hohe Konzentrationen für eine Induktion eingesetzt werden, dass bereits eine deutliche Wachstumshemmung der Transformanden eintrat. Somit ist unklar, ob diese Induktion durch die Substanz oder durch allgemeinen Streß erzeugt wurde. Eine signifikante, mehr als 3fache Induktion der *acrAB*-Expression wurde durch Phloretin und Naringenin erzielt. Alle anderen Substanze hatten nur einen geringen Effekt. Eine Induktion durch Naringenin erfolgte jedoch erst durch die wachstumshemmende Konzentration von 125 µg/ml, so dass nur Phloretin die *acrR*- und *acrAB*-Expression eindeutig induzierte. Zusätzlich wurde Salicylsäure überprüft, die kein Substrat darstellt, jedoch für eine induzierende Wirkung der *acrAB*-Genexpression bei *E. coli* bekannt ist. Es zeigte sich, dass die *acrR*-Expression unbeeinflusst blieb, die *acrAB*-Promotoraktivität bei wachstumsinhibierenden Substanzkonzentrationen mehr als 2fach erhöht war. Des weiteren ist eine Induktion von *acrAB* durch Salzstress beschrieben worden (Ma et al., 1995), was jedoch für die Expression der Gene aus *E. amylovora* nicht beobachtet werden konnte.

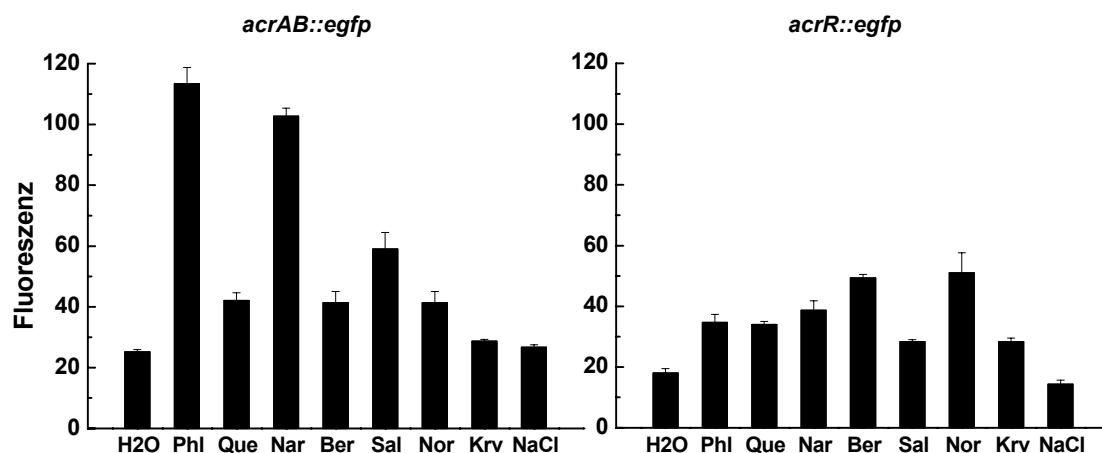


Abb. 33. Quantitative Bestimmung der Promotoraktivitäten von *acrAB* und *acrR* mittels transkriptioneller Fusionen mit dem Reportergen *egfp*. Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Promotoraktivitäten wurde mittels Fluoreszenzmessung des gebildeten EGFPs überprüft. Die Fluoreszenz wurde auf eine OD = 0,1 berechnet. Ber, Berberin (125 µg/ml); Krv, Kristallviolett (1,3 µg/ml); Na, Naringenin (125 µg/ml); Nor, Norfloxacin (0,25 µg/ml); Phl, Phloretin (31,1 µg/ml); Que, Quercetin (63 µg/ml); Sal, Salicylsäure (0,2 µg/ml); NaCl (0,5 M).

4.11 Hemmung des Wachstums von *E. amylovora* durch Epiphyten

Bisher konnte dem AcrAB-Transportsystem eine Bedeutung in der Virulenz des Feuerbrandpathogens zugewiesen werden. Allerdings wurde kein Phänotyp für die *norM*-Mutante während der Interaktion mit der Pflanze gefunden.

Das Feuerbrandpathogen ist jedoch nicht nur den antimikrobiellen Substanzen der pflanzlichen Abwehr ausgesetzt, sondern auch den Antibiotika, die während eines epiphytischen Wachstums von einigen anderen Mikroorganismen produziert werden können. *E. amylovora* muss mit ihnen um Raum- und Nahrungsressourcen konkurrieren und eine Resistenz gegenüber deren toxischen Sekundärmetaboliten kann vorteilhaft sein. Ein epiphytisches Wachstum von *E. amylovora* erfolgt hauptsächlich auf der Blüte, wo das Bakterium hohe Populationsdichten im Vergleich zu anderen Pflanzenteilen erreicht (Miller, 1984; Thomson, 1986). Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die primäre Infektion einer Pflanze (Wilson et al., 1989a; 1989b) und einer weiteren Verbreitung des Pathogens durch z. B. Bienen dar (Emmet & Baker, 1971). Es ist bekannt, dass der Lebensraum auf der Blütenoberfläche auch von anderen Mikroorganismen besiedelt wird, wie z. B. von dem mit *E. amylovora* verwandtem Bakterium *Pantoea agglomerans* (Hattingh et al., 1986). Es handelt sich dabei um einen weit verbreiteten Epiphyten, von dem sich einige Stämme durch die Produktion von Antibiotika auszeichnen (Ishimaru et al., 1988; Kearns & Mahanty, 1998; Vanneste et al., 1992; Winkelmann et al., 1980; Wright et al., 2001). Diese Stämme werden als potentielle Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Feuerbrandpathogens betrachtet (Johnson & Stockwell, 2000).

4.11.1 Isolation Antibiotika-produzierender Epiphyten

Die Isolation von epiphytischen Mikroorganismen erfolgte aus Blüten der Wirtspflanzen von *E. amylovora*. Dafür wurden von 21 Bäumen, darunter Birne, Apfel, Quitte und Weißdorn, jeweils 12-15 Blüten entfernt, mazeriert und anschliessend die erhaltene Suspension auf LB-Agar ausplattiert (Abb. 34). Nach Inkubation bei 28°C wurden pro Blütenprobe etwa 4-6 verschiedene Koloniemorphologien beobachtet. Darunter befanden sich nur wenige Pilz- bzw. Hefe-Kolonien. Die meisten Kolonien wurden von Bakterien gebildet.

Von jeder Blütenprobe wurden etwa 20-30 Kolonien auf AMM2-Agarplatten überimpft und die Produktion antimikrobiell wirksamer Substanzen im Agardiffusionstest überprüft. Dafür wurde *E. amylovora* sowie dessen *norM*- bzw. *acrB*-Mutante als Teststämme verwendet. Es ergab sich, dass von über 550 getesteten Epiphyten-Kolonien 70 Isolate eine Hemmwirkung auf mindestens einen der drei Teststämme besaßen. Um diese

Wachstumshemmung quantitativ zu erfassen, wurden alle 70 Kolonien in MM1-Flüssigmedium kultiviert und die Überstände erneut im Agardiffusionstest überprüft. 43 Isolate produzierten in diesem Medium keine antimikrobiellen Substanzen. Von den 27 Isolaten, die eine Wachstumshemmung erzeugten, inhibierten 18 signifikant die *norM*-Mutante im Vergleich zum *E. amylovora* Wildtyp und der *acrB*-Mutante. 5 Isolate hemmten alle drei Teststämme und nur 4 Isolate wurden gefunden, die speziell das Wachstum der *acrB*-Mutante inhibierten. Sämtliche Kolonien, die eine antimikrobielle Wirkung auf *E. amylovora* aufwiesen, wurden von Bakterien gebildet, die von Apfel oder Quitte isoliert wurden.

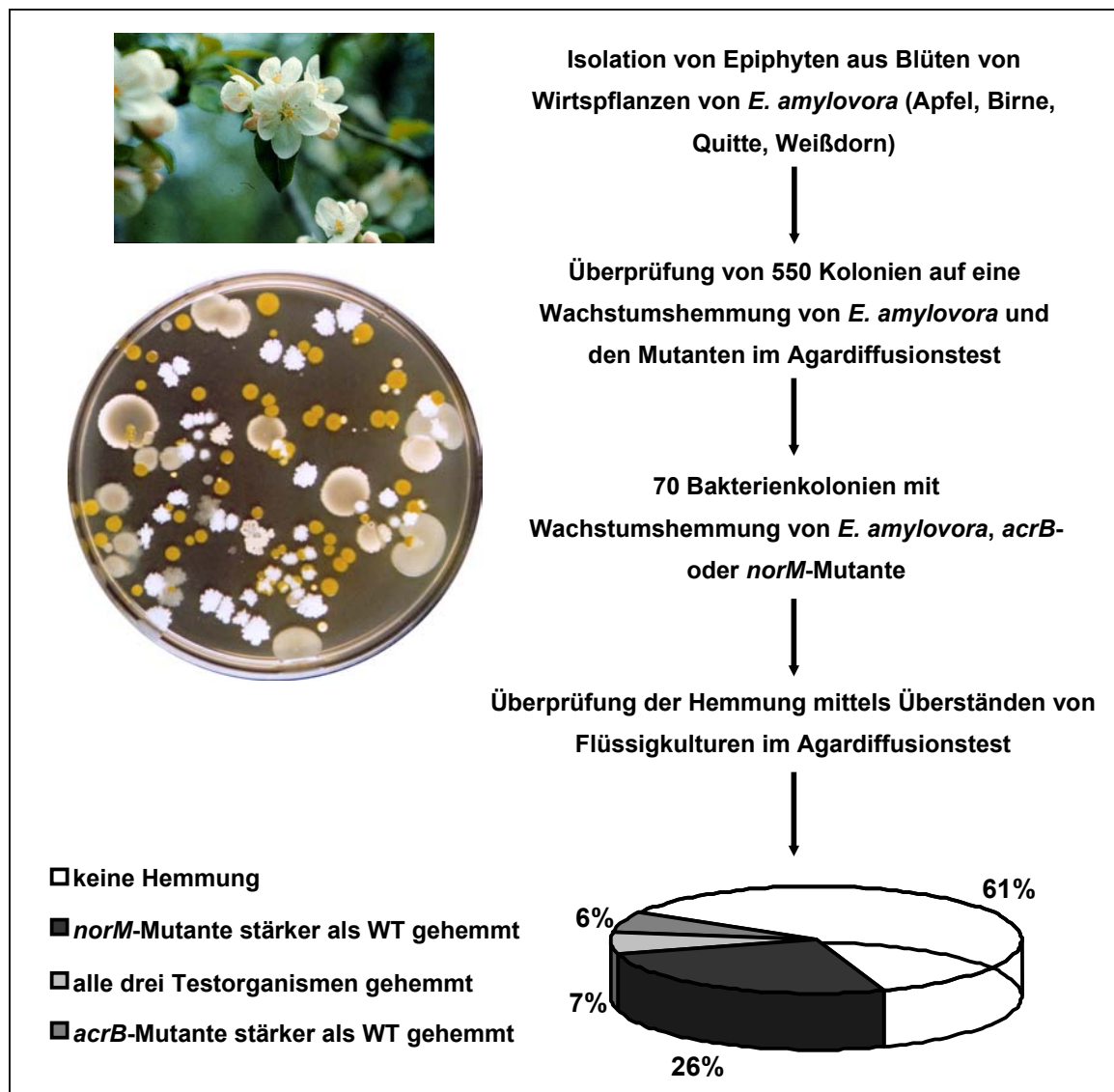


Abb. 34. Isolation von epiphytischen Mikroorganismen mit Hemmwirkung auf *E. amylovora* und dessen Mutanten aus Blüten verschiedener Wirtspflanzen. WT, *E. amylovora* Wildtyp.

4.11.2 Charakterisierung der Epiphyten

Im folgenden wurden die zuvor isolierten, epiphytisch lebenden Bakterien hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung näher untersucht. In Tab. 18 ist die Wachstumshemmung der *norM*- sowie der *acrB*-Mutante durch Kulturüberstände der Isolate anhand der Hemmhofdurchmesser aus dem Agardiffusionstest dargestellt. Die Testplatten wurden bei 18°C und 28°C inkubiert, da aus vorangegangenen Experimenten eine erhöhte Expression des *norM*-Gens bei 18°C bekannt war. Es zeigte sich, dass die Überstände der 18 Isolate, die die *norM*-Mutante deutlich hemmten, den Wildtyp und die *acrB*-Mutante bei 28°C ebenfalls inhibierten. Allerdings wurden keine klaren Höfe wie bei der *norM*-Mutante verursacht, sondern es erfolgte nur eine partielle Hemmung des Wachstums dieser Stämme (Abb. 35). Bei 18°C dagegen wurde allein die *norM*-Mutante inhibiert, was auf das Fehlen des bei 18°C verstärkt exprimierten Transportergens zurückzuführen sein könnte. Die schwache Hemmung der *acrB*-Mutante durch 4 andere Isolate erfolgte im Gegensatz dazu nicht temperaturabhängig.

Tab. 18. Überprüfung der Produktion antimikrobieller Substanzen durch epiphytische Bakterien mittels Überständen aus MM1-Flüssigkulturen im Agardiffusionstest. Als Testorganismen wurden der *E. amylovora* Wildtyp sowie die *norM*- und *acrB*-Mutante eingesetzt. Die Inkubation der Testplatten erfolgte bei 18°C und 28°C. Spec., Spectinomycin.

Isolat		Hemmhofdurchmesser [mm]						Kolonie- farbe	Herkunft
		Wildtyp		<i>norM</i> - Mutante		<i>acrB</i> - Mutante			
		18°C	28°C	18°C	28°C	18°C	28°C		
QT	2/1	(15) ¹	22	17(24)	30	0	25	gelb	Quitte, Bot. Garten, Marburg
	2/5	0	(27)	19(26)	33	0	(26)	gelb	
	2/7	0	(24)	16(25)	30	0	(24)	gelb	
Bel	2/3	0	(20)	(23)	27	0	(21)	gelb	Apfel, Eisemroth
	2/5	0	(19)	(19)	23	0	(21)	gelb	
	2/7	0	(24)	16(25)	27	0	(28)	gelb	
Bel	3/1	0	(25)	15(25)	27	0	(25)	gelb	Zierapfel, Eisemroth
	3/2	0	(25)	16(24)	26	0	(24)	gelb	
	3/3	0	(26)	16(25)	26	0	(33)	gelb	
	3/4	0	(25)	12(22)	26	0	(24)	gelb	
	3/5	0	(25)	15(22)	26	0	(24)	gelb	
	3/6	0	(22)	(22)	(24)	0	(21)	gelb	

	3/7	0	(22)	(23)	25	0	(22)	gelb	
	3/8	0	(25)	14(25)	25	0	(24)	gelb	
BB	1/1	(12)	0	16	15	(12)	0	weiß	Apfel, Bauerbach
MR	4/1	0	(25)	20	25(32)	0	(25)	gelb	Apfel, Marburg- Wehrda
	4/3	0	(25)	18	25(32)	0	(25)	gelb	
MR	5/1	0	22	17(24)	25	0	25	gelb	Spalierapfel, Bot. Garten, Marburg
Bel	2/1	0	0	0	0	15	13	weiß	Apfel, Eisemroth
	2/2	0	0	0	0	15	13	weiß	
	2/4	0	0	0	0	15	12	weiß	
	2/8	0	0	0	0	15	13	weiß	
Spec. 5 mg/ml		17	27	18	27	18	28		

¹ Klammern geben eine partielle Hemmung des Teststammes an

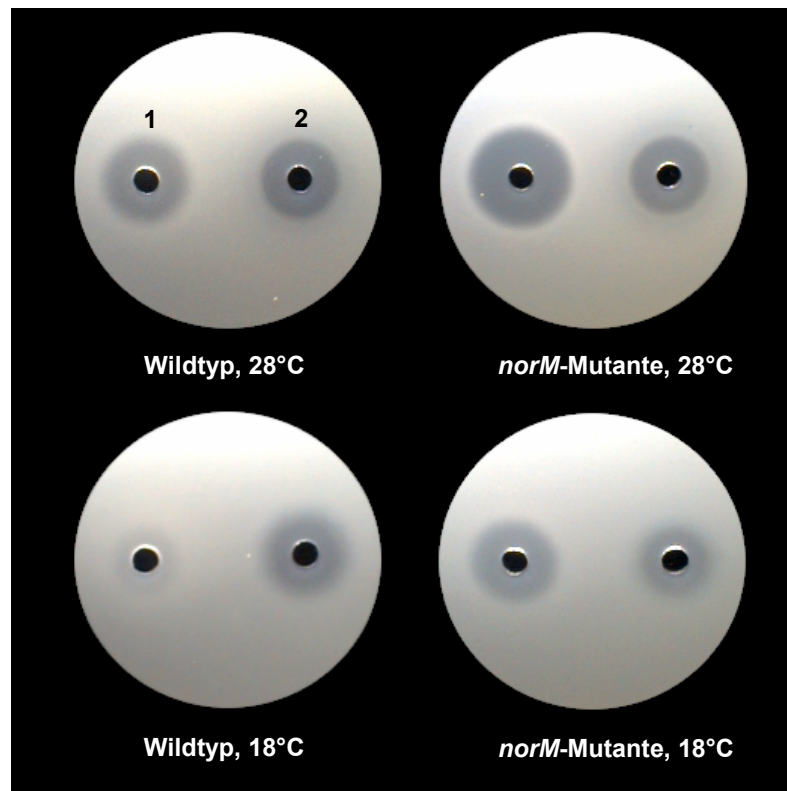


Abb. 35. Vergleich der Wachstumshemmung von *E. amylovora* Wildtyp und der *norM*-Mutante durch den Überstand einer Epiphytenflüssigkultur im Agardiffusionstest. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 18°C und 28°C. 1, QT2/5; 2, Spectinomycin 5 mg/ml.

Alle Isolate, die eine Hemmung des Wachstums der *norM*-Mutante verursachten, ähneln sich in ihrer Koloniemorphologie, mit Ausnahme von Isolat BB1/1. Sie sind alle gelb pigmentiert und bilden dieselbe Kolonieform, so dass sie vermutlich einer Bakterien-Art zugeordnet werden können. Aufgrund dessen wurde jeweils ein Vertreter der Isolate einer Pflanze ausgewählt und als Stamm bezeichnet. Die Stämme QT2/5, Bel2/7, Bel3/1, MR4/1 und MR5/1 wurden anhand der Sequenzierung der 16S rRNA durch Dr. P. Dunfield (Max Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) und anschließenden Datenbankvergleichen als *Panthoea agglomerans* identifiziert. Eine 16S rRNA-Analyse des Stammes Bel2/1, der als Vertreter derjenigen Isolate ausgewählt wurde, die die *acrB*-Mutante hemmten, ergab eine Zugehörigkeit zu *Pseudomonas fluorescens*.

Zusätzlich zu aus Blüten isolierten *P. agglomerans*-Stämmen, wurden weitere Isolate dieser Art untersucht, die von Blättern der Sojabohne stammen. Sie wurden von Dr. B. Völksch (Friedrich-Schiller-Universität, Jena) zur Verfügung gestellt. Im Agardiffusionstest wurden etwa 70 *P. agglomerans*-Stämme auf eine Hemmwirkung geprüft. Davon inhibierten drei das Wachstum der *norM*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp und der *acrB*-Mutante. Die Stämme 2b/89, 15b/89 und 62b/90 zeigten dieselbe temperaturabhängige Wirkung wie die zuvor getesteten, antimikrobiell wirksamen Blütenisolate (Tab. 19).

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die charakteristische Hemmung des Wachstums der *norM*-Mutante bei 18°C auf das Fehlen von NorM zurückgeführt werden kann. Dieser Nachweis erfolgte durch Komplementation der Mutante mit einem intakten *norM*-Gen.

Zunächst erfolgte die Konstruktion des Plasmids pBBR2.*norM*. Dafür wurde zunächst das 3,2 kb-große Insert aus Plasmid pBBR.*norM* mit Hilfe des Restriktionsenzym *ClaI* entfernt und in den Kanamycin-resistenten Vektor pBBRMCS-2 kloniert. Dabei wurde das *norM*-Gen so orientiert, dass es von seinem nativen Promotor transkribiert wird. Die Überprüfung der Komplementation erfolgte im Agardiffusionstest. Es wurde die Wirkung der Überstände von MM1-Flüssigkulturen der *P. agglomerans*-Stämme getestet (Tab. 19). Dabei zeigte sich, dass die Wachstumshemmung der *norM*-Mutante durch das Plasmid pBBR2.*norM* vollständig aufgehoben wurde. Interessanterweise wuchs die komplementierte *norM*-Mutante in Anwesenheit des Kulturüberstandes aller getesteten *P. agglomerans*-Stämme im Gegensatz zum Wildtyp auch bei 28°C unbeeinträchtigt, was auf einen *norM*-Kopiezahleffekt zurückzuführen sein könnte.

Tab. 19. Überprüfung der Komplementation der *norM*-Mutante mit pBBR2.*norM* mittels Agardiffusionstest. Es wurde die Hemmwirkung der Überstände von MM1-Flüssigkulturen der *P. agglomerans*-Stämme an der *norM*-Mutante im Vergleich zum *E. amylovora* Wildtyp getestet. Die Inkubation der Testplatten erfolgte bei 18°C und 28°C. Spec., Spectinomycin.

<i>P. agglomerans</i> Stamm	Hemmhofdurchmesser [mm]					
	Wildtyp		<i>norM</i> -Mutante (pBBR1MCS-2)		<i>norM</i> -Mutante (pBBR2. <i>norM</i>)	
	18°C	28°C	18°C	28°C	18°C	28°C
QT2/5	0	(25) ¹	16(24)	25	0	0
Bel2/7	0	(25)	(23)	26	0	0
Bel3/1	0	(25)	14(22)	26	0	0
MR4/1	0	(24)	14(22)	26	0	0
MR5/1	0	(25)	16(22)	27	0	0
2b/89	0	(26)	20(25)	30	0	0
15b/89	0	(19)	(21)	29	0	0
62b/90	0	(26)	20(25)	30	0	0
Spec. 5 mg/ml	20	28	18	27	18	27

¹ Klammern geben eine partielle Hemmung des Teststammes an

Literaturangaben zufolge, kann die Wirkung antimikrobieller Sekundärmetabolite von einigen *P. agglomerans*-Stämmen durch die Zugabe von Aminosäuren aufgehoben werden, da diese Verbindungen Enzyme aus Aminosäure-Biosynthesewegen inhibieren (Wodzinski & Paulin, 1994; Wright et al., 2001). Um den wachstumshemmenden Effekt der Sojabohnen- und Blütenisolate näher zu charakterisieren, wurden im Agardiffusionstest zu den Kulturüberständen L-Arginin, L-Histidin und L-Leucin gegeben. Es zeigte sich, dass die Hemmwirkung der *P. agglomerans*-Stämme durch L-Histidin aufgehoben werden konnte. Diese Stämme produzieren somit eine oder mehrere Verbindungen, die alle in denselben Biosynthese-Weg von *E. amylovora* eingreifen.

4.11.3 Transposon-Mutagenese von *P. agglomerans* 2b/89

Um genauere Aussagen über den genetischen Hintergrund der Synthese der antimikrobiell auf die *norM*-Mutante wirkenden Verbindungen aus *P. agglomerans* machen zu können, wurde mittels Transposon-Mutagenese versucht, die Biosynthese der Hemmsubstanzen im *P. agglomerans*-Stamm 2b/89 auszuschalten. Der Stamm 2b/89 wurde ausgewählt, da er eine besonders deutliche Hemmung verursachte.

Für die Mutagenese wurde das Plasmid pCAM140-NotI von Dr. Helge Weingart (International University Bremen) zu Verfügung gestellt. Es handelt sich bei diesem Plasmid um ein pCAM140-Derivat (Wilson et al., 1995), aus dessen Transposon mTn5SS*gusA40* das Reportergen *gusA* durch die Restriktionsendonuklease *NotI* entfernt wurde. Innerhalb der ‚inverted repeats‘ des Transposons befindet sich nun das Resistenzgen gegen Streptomycin und Spectinomycin.

Die Transposon-Mutagenese erfolgte durch Elektroporation des Plasmids pCAM140-NotI in kompetente *P. agglomerans* 2b/89-Zellen. Die so erzeugten Mutanten wurden auf AMM2-Platten mit 200 µg/ml Spectinomycin ausplattiert, 48 h bei 28°C inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Agardiffusionstests auf eine Hemmwirkung gegen die *norM*-Mutante von *E. amylovora* untersucht. Dafür wurden mehr als 500 Mutanten auf mit der *norM*-Mutante inokulierten AMM2-Testplatten geimpft. Nach Inkubation bei 18°C konnte eine Wachstumshemmung der Mutante durch die *P. agglomerans*-Transposon-Mutanten bewertet werden. Es befanden sich darunter 23 Mutanten, die keine Hemmung mehr verursachten. Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden diese in MM1-Flüssigmedium kultiviert und die Überstände wiederum im Agardiffusionstest mit der *norM*-Mutante als Teststamm überprüft. Es ergab sich, dass 18 Transposon-Mutanten noch eine schwache Hemmung verursachten und nur für 5 Mutanten das vollständige Ausbleiben einer inhibitorischen Wirkung bestätigt werden konnte. Um die Lokalisation der Transposon-Insertion in diesen 5 Mutanten festzustellen, wurden Southernblot-Analysen durchgeführt. Dafür wurde genomische DNA und die beiden in *P. agglomerans* 2b/89 vorkommenden, natürlichen Plasmide (ca. 150 kb und 50 kb) isoliert und mit einer Spectinomycin-Sonde hybridisiert. Erste Ergebnisse zeigten, dass sich die Insertion in einer mit 30g/b bezeichneten Mutante auf dem kleineren der beiden Plasmide befindet. Für die anderen Mutanten konnten keine Signale detektiert werden. Anschließend erfolgte eine Subklonierung des Transposon enthaltenden DNA-Fragmentes aus Mutante 30g/b in pBBR1MCS. Eine partielle Sequenzierung einer etwa 500 bp umfassenden Nukleotidsequenz aus der Umgebung des Transposons hat jedoch bisher keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Genen ergeben. Somit bleibt die Aufklärung der Biosynthese-Gene der Hemmsubstanz Gegenstand nachfolgender Untersuchungen.

5 DISKUSSION

Phytopathogene Mikroorganismen sind in ihrer Umwelt einer Vielzahl toxischer Substanzen ausgesetzt. Zum einen müssen sie während der Infektion ihres Wirtes die Wirkung von niedermolekularen, antimikrobiellen Verbindungen, den Phytoalexinen tolerieren, die eine wesentliche Komponente der pflanzlichen Abwehr darstellen. Zum anderen kann während des epiphytischen Wachstums das Pathogen mit antibiotisch wirkenden Substanzen in Kontakt kommen, die von anderen pflanzenassoziierten Mikroorganismen produziert werden. *E. amylovora* muss mit letzteren um Raum- und Nahrungsressourcen konkurrieren und eine Resistenz gegenüber deren toxischen Sekundärmetaboliten ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Besiedlung der Pflanze.

Phytopathogene haben verschiedene Strategien zur Detoxifizierung von antimikrobiellen Substanzen entwickelt. Dazu gehören spezielle, gegen eine bestimmte Verbindung gerichtete Mechanismen, wie die enzymatische Inaktivierung oder die Veränderung des zellulären Zielmoleküls (Walsh, 2000). Zu den allgemeineren Mechanismen zählt die Behinderung des Influxes durch die Reduktion von Porinen in der Membran oder der gesteigerte aktive Export mittels Transportproteinen. Dadurch wird die Akkumulation der Toxine in der Zelle verhindert. Eine besondere Bedeutung für den Export von Toxinen besitzen sog. Multidrug-Efflux-Pumpen, die charakteristischerweise ein breites Spektrum an Substraten aufweisen. In Bakterien können diese Transporter aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz fünf verschiedenen Transporter-Familien zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um die ‚ATP-binding cassette‘ (ABC)-, die ‚major facilitator‘ (MF)-, die ‚resistance-nodulation-cell division‘ (RND)-, die ‚multidrug and toxic compound extrusion‘ (MATE)- und die ‚small multidrug resistance‘ (SMR)-Familie (Paulsen et al., 1996). Generell ist die Rolle des Multidrug-Effluxes bei der Krankheitsausbildung durch phytopathogene Bakterien bisher wenig untersucht. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von zwei Multidrug-Efflux-Proteinen auf die Pathogenese des Feuerbrandes, verursacht durch *E. amylovora*, untersucht werden.

5.1 Identifizierung und Charakterisierung der Multidrug-Efflux-Transporter NorM und AcrAB

Während eines Screenings nach temperaturabhängig exprimierten Genen in *E. amylovora*, identifizierte Dr. C. Goyer das für ein Multidrug-Efflux-Protein kodierende Gen *norM* (Goyer & Ullrich, 1999). Das Screening wurde durchgeführt, da, analog zu Humanpathogenen (Mekalanos et al., 1992), auch in phytopathogenen Bakterien verschiedene Virulenzfaktoren eine temperaturregulierte Expression aufweisen (Smirnova et al., 2001). So ist beispielsweise die Produktion der Phytotoxine Phaseolotoxin in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* und Coronatin in *P. syringae* pv. *glycinea* bei 18°C höher als bei der optimalen Wachstumstemperatur von 28°C (Nüske & Fritsche, 1989; Ullrich et al., 1995). Von *Agrobacterium tumefaciens* ist bekannt, dass die Formierung von T-Pili bei 20°C, nicht aber bei 28°C stattfindet und demzufolge die Ti-Plasmid-Übertragung in die Pflanzenzelle temperaturabhängig erfolgt (Baron et al., 2001). Aus *E. amylovora* selbst wurde die erhöhte Expression des Levansucrase-Gens *lsc* bei 18°C im Vergleich zu 28°C beschrieben (Bereswill et al., 1997). Wei et al. (1992) zeigten ebenfalls eine höhere Promotoraktivität der Gene des *hrp*-Regulons, das in die Symptomausprägung in Wirtspflanzen und in die HR-Auslösung in Nicht-Wirtspflanzen involviert ist, bei 18°C im Vergleich zu 28°C. Von Gaudriault et al. (1997) wurde von *dspA* aus *E. amylovora*, dessen Genprodukt Ähnlichkeit zu einem Avirulenzprotein aus *P. syringae* pv. *tomato* besitzt, eine höhere Expression bei 25°C als bei 30°C beschrieben.

Während des Screenings nach temperaturregulierten Genen in *E. amylovora* wurden Transposon-Mutanten erzeugt, bei denen ein miniTn5, das das Reportergen *gusA* und eine Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz enthält, zufällig ins Genom inserierte. Bei der indirekten Bestimmungen der Promotoraktivitäten bei 18°C und 28°C durch die Glucuronidase-Aktivitätsmessung besaßen 190 Promotoren eine höhere Aktivität bei 18°C im Vergleich zu 28°C, wohingegen nur 56 Gene eine höhere Expression bei 28°C aufwiesen.

Das Feuerbrandpathogen ist an klimatische Bedingungen angepasst, wo niedrige Temperaturen (15-18°C) mit hoher Luftfeuchtigkeit einhergehen. Dadurch entsteht auf der Pflanzenoberfläche ein Wasserfilm, der für die Infektion der Pflanze notwendig ist. Da das Pathogen nur über natürliche Öffnungen oder Verwundungen in seinen Wirt eindringen kann, muss es sich mit Hilfe seiner peritrichen Begeißelung im Wasserfilm zu diesen aktiv hinbewegen. Interessanterweise wurde während des Screenings eine bei 18°C erhöhte Expression eines Gens aus dem Flagellenbiosynthese-Operon nachgewiesen. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen von Dr. C. Goyer und aus Literaturangaben kann spekuliert

werden, dass niedrige Temperaturen dem Pathogen optimale Bedingungen für eine Infektion signalisieren, was zu einer Veränderung der Genexpression führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die temperaturabhängige Expression des *norM*-Gens näher untersucht. Dafür wurde die GUS-Aktivität in der entsprechenden Transposon-Mutante während des Wachstums in einer Submerskultur ermittelt. Es zeigte sich, dass der *norM*-Promotor in allen Wachstumsphasen eine etwa 2fach höhere Aktivität bei 18°C besaß als bei 28°C. Es wurde keine wachstumsabhängige Genexpression beobachtet. In einem phytopathogenen Mikroorganismus wurde bisher noch kein temperaturreguliertes Transportprotein beschrieben. Bei Humanpathogenen wurde beispielsweise eine Temperaturregulation von dem Transportsystem RosAB in *Yersinia*-Spezies untersucht (Bengoechea & Skurnik, 2000). RosAB ist ein Vertreter der MF-Familie und vermittelt bei 37°C eine stärkere Resistenz gegenüber kationischen, antimikrobiellen Peptiden als bei Raumtemperatur.

Um das während der Transposon-Mutagenese identifizierte *norM* und dessen Genprodukt charakterisieren zu können, erfolgte zunächst die Klonierung des Gens. Die Analyse der vollständigen Nukleotidsequenz von *norM* ergab, dass das Gen von einem eigenen Promotor transkribiert wird und nicht Teil eines Operons ist. Viele für Multidrug-Efflux-Proteine kodierende Gene Gram-negativer Bakterien sind zusammen mit Genen für ein periplasmatisches Protein oder einem ‚outer membrane factor‘ (OMF) in einem Operon organisiert (Poole, 2001a). Diese Gene kodieren für Transportsysteme, die einen Export durch die innere bzw. äußere Membran ermöglichen. Bei dem Protein NorM aus *E. amylovora* ist anzunehmen, dass es als Einzelkomponententransporter seine Substrate in das Periplasma schleust.

Datenbankvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *norM* zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu Transportern der von Brown et al. (1999) begründeten ‚multidrug and toxic compound extrusion‘ (MATE)-Familie, insbesondere zu der Unterfamilie der bakteriellen Multidrug-Efflux-Proteine. Die meisten Vertreter dieser Unterfamilie sind bisher funktionell nicht charakterisiert. Ausnahmen bilden NorM aus *E. coli* und *Vibrio parahaemolyticus* sowie VcmA aus *Vibrio cholerae* (Huda et al., 2001; Morita et al., 1998; 2000). Da die phylogenetische Verwandtschaft oft mit einer gemeinsamen Funktion korreliert, wurden die Resistenzen, die für *norM* aus *E. amylovora* identifiziert wurden, mit Substratspektren dieser Transporter aus Literaturangaben verglichen. Dafür erfolgte eine heterologe Expression von *norM* in *E. coli* KAM3, einem Stamm, der eine Mutation in dem wichtigsten Multidrug-Efflux-Transporter AcrAB trägt und deshalb gegenüber einer Vielzahl toxischer Substanzen

sensitiv ist. Des weiteren erfolgte eine Überprüfung einer *norM*-Mutante von *E. amylovora* im Vergleich zum Wildtyp. Aus Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen verschiedener Verbindungen ergab sich ein Substratspektrum für NorM, das das Antibiotikum Norfloxacin, das Alkaloid Berberin aus Berberitze, die Farbstoffe Kristallviolett und Ethidiumbromid, sowie das Detergenz SDS beinhaltet. Damit wurden Substrate identifiziert, die für NorM aus *E. coli* und *V. parahaemolyticus* sowie VcmA aus *V. cholerae* bereits beschrieben wurden (Huda et al., 2001; Morita et al., 1998). Im Gegensatz zu NorM aus *V. parahaemolyticus* und VcmA konnten die Aminoglycoside Spectinomycin und Kanamycin von NorM aus *E. amylovora* und *E. coli* nicht transportiert werden. Damit besitzt NorM aus *E. amylovora* ein ähnliches Substratspektrum wie das Multidrug-Efflux-Protein NorM aus *E. coli*. Bei den Substraten handelt es sich hauptsächlich um hydrophobe Kationen (Abb. 36).

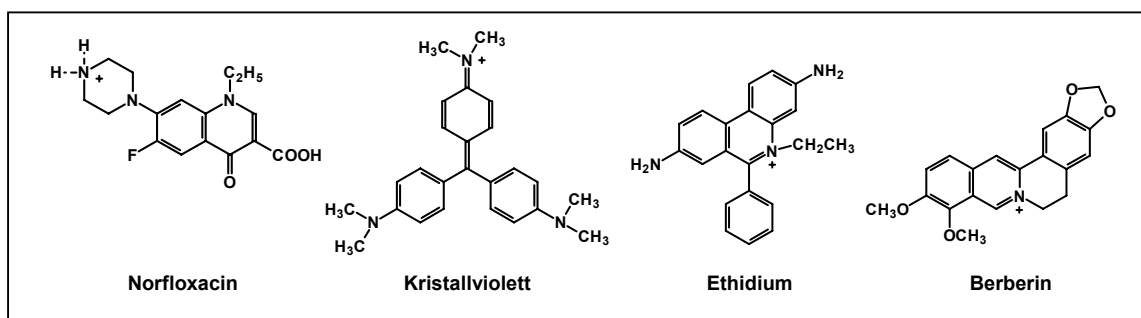


Abb. 36. Strukturformeln des Substrates von NorM aus *E. amylovora*. Die schwach basischen Verbindungen sind in ihrer kationischen Form dargestellt.

Der Transportmechanismus von NorM aus *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* wurde von Morita et al. (2000) bzw. Huda et al. (2001) näher untersucht. Bei beiden Transportern erfolgt die Translokation durch einen Na^+ /Substrat-Antiport. Dies ist eine Besonderheit, da bisher von sekundären Transportern lediglich ein H^+ /Substrat-Antiport für einen Multidrug-Efflux beschrieben wurde (Putman et al., 2000). Allerdings sind dies die einzigen Transporter der MATE-Familie, die in dieser Hinsicht untersucht wurden. Es bleibt zu klären, durch welchen Mechanismus NorM aus *E. amylovora* und *E. coli* sein Substrat transportiert.

Basierend auf Genom-Sequenzierungen verschiedener Organismen konnte die Verbreitung von Multidrug-Efflux-Proteinen analysiert werden (Paulsen et al., 2000; 2001). Demnach besitzt ein Organismus meist mehrere dieser Proteine, oft aus unterschiedlichen Familien. So wurden für *E. coli* 37 potentielle Multidrug-Efflux-Pumpen vorhergesagt (Nishino & Yamaguchi, 2001). Eine dieser Pumpen, AcrB, ist sehr gut charakterisiert und spielt nachweislich eine wichtige Rolle für die Resistenz von *E. coli* gegenüber einer Vielzahl toxischer Substanzen (Nishino & Yamaguchi, 2001; Okusu et al., 1996; Sulavik et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass auch *E. amylovora* neben NorM weitere Multidrug-Efflux-Proteine besitzt. Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft zu *E. coli* sollte ein AcrB-ähnliches Protein zusätzlich auf seinen Einfluss auf die Pathogenese des Feuerbrandes untersucht werden.

Über funktionelle Komplementation der *E. coli* *acrAB*-Mutante KAM3 konnte ein DNA-Fragment aus *E. amylovora* kloniert werden, in dessen Sequenz drei ORFs identifiziert wurden. Eine Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz dieser ORFs ergab signifikante Ähnlichkeiten zu einem Transportprotein der inneren Membran, einem periplasmatischen und einem regulatorischen Protein.

Die Regulatoren von Multidrug-Efflux-Transportern werden generell vier Familien, die nach den Proteinen AraC, MarR, MerR bzw. TetR benannt wurden, zugeordnet (Grkovic et al., 2002). Diese Klassifizierung korreliert nicht mit der Transporter-Familie, deren Expression kontrolliert wird, sondern basiert allein auf Sequenzähnlichkeiten in der DNA-bindenden Domäne.

Der Regulator, AcrR, aus *E. amylovora* besitzt Sequenzähnlichkeiten von mehr als 70% zu charakterisierten AcrR-Proteinen aus *E. coli* und *Enterobacter aerogenes* (Ma et al., 1996; Pradel & Pages, 2002). Diese Proteine gehören der TetR-Familie an (Aramaki et al., 1995) und sind für die Repression von Genen zuständig, die für Multidrug-Efflux-Transporter der RND-Familie kodieren (Tseng et al., 1999).

Zwei Mitglieder der TetR-Familie, die die Transkription von Transportern der ‚major facilitator‘ (MF)-Familie reprimieren, konnten bisher kristallographisch näher charakterisiert werden (Pau et al., 1998). Dies sind TetR und QacR. TetR reguliert die Expression des Tetracyclintransporters TetA aus *E. coli* (Hillen und Berens, 1994) während QacR den Multidrug-Transporter QacA aus *Staphylococcus aureus* reguliert (Brown & Scurray, 2001; Grkovic et al., 1998). Durch die Auflösung der Kristallstruktur von TetR (Hinrichs et al., 1994; Kisker et al., 1995; Orth et al., 1999; 2000) und QacA (Schumacher et al., 2001; 2002) konnten genauere Aussagen über Dimerisierung, Liganden- und DNA-Bindedomänen getroffen und daraus Rückschlüsse auf die Funktionsweise ähnlicher Proteine gemacht werden.

QacR besitzt 9 α -Helices, TetR dagegen 10. Die ersten 3 α -Helices beider Proteine bilden die DNA-Bindedomäne. α -Helix 2 und 3 weisen ein typisches ‚helix-turn-helix‘ (HTH)-Motiv auf (Huffman & Brennan, 2002; Schumacher et al., 2002). Die aus 7 Aminosäuren bestehende α -Helix 3 dient dabei als Erkennungshelix, die direkt mit der großen Furche der DNA wechselwirkt. Helices 5 bis 10 von TetR sind in die Tetracyclin-Bindung und Dimerisierung

involviert. TetR bindet als Homodimer an 2 palindromische Operatorsequenzen und reguliert so die Transkription der divergent orientierten Gene *tetR* und *tetA* (Kisker et al., 1995). Bei QacR wird die Dimerisierungs- und Ligandenbindungsdomäne von den Helices 4-9 gebildet. QacR bindet im Unterschied zu TetR als Homotetramer (Schumacher et al., 2001; 2002).

Für AcrR aus *E. amylovora* wurde durch Computer-Analyse mit dem Programm 3D-PSSM (<http://www.sb.bio.ic.ac.uk/servers/3dpssm>) (Fischer et al., 1999; Kelley et al., 1999) eine Sekundärstruktur vorhergesagt, wobei 9 durch Schleifen verbundene α -Helices ermittelt wurden (Abb. 37). Das in der TetR-Familie konservierte Sequenzmotiv, das ein HTH-Motiv enthält, wurde durch eine PROSITE-Datenbanksuche (<http://www.expasy.org/prosite/>) (Bucher & Bairoch, 1994; Falquet et al., 2002) im Bereich der α -Helices 2 und 3 festgestellt. Entsprechend diesen Analysen und analog zu den Untersuchungen an TetR und QacR, könnten die ersten drei α -Helices die DNA-Bindedomäne von AcrR aus *E. amylovora* und nachfolgende α -Helices die Dimerisierungs- und Ligandenbindungsdomäne darstellen.

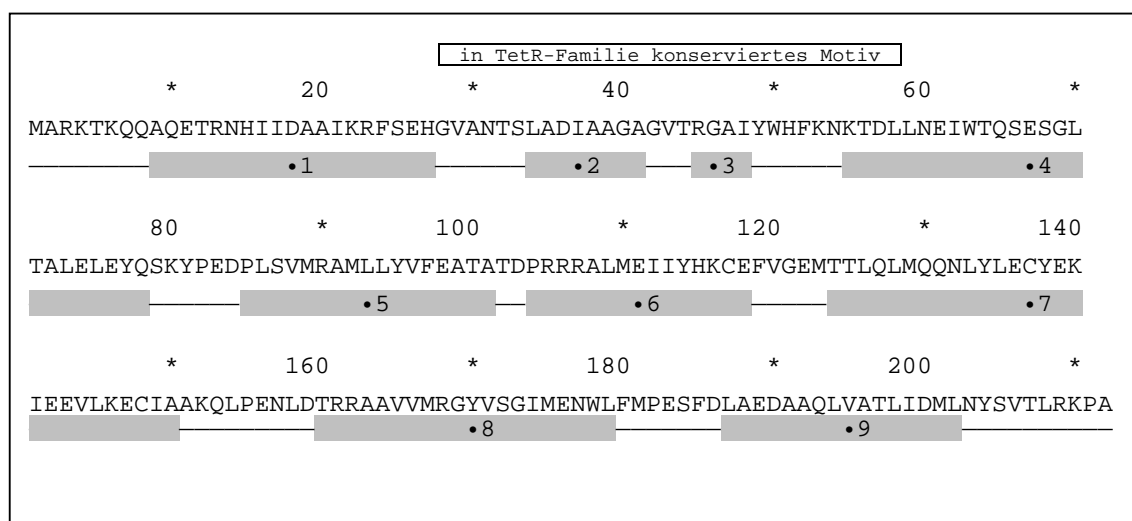


Abb. 37. Sekundärstruktur von AcrR aus *E. amylovora*, erstellt durch eine Computer-Analyse mit dem Programm 3D-PSSM. Die Ermittlung des typischen Sequenzmotivs der TetR-Familie in der DNA-Bindedomäne erfolgte durch eine PROSITE-Datenbanksuche.

Aus Untersuchungen, die an AcrR-ähnlichen Proteinen durchgeführt wurden, kann vermutet werden, dass AcrR aus *E. amylovora* die Transkription der divergent orientierten Gene, *acrA* und *acrB*, reprimiert (Duque et al., 2001; Hagmann et al., 1995; Ma et al., 1996; Moore et al., 1999). Von sequenzähnlichen *acrA/B*-Genen, die in anderen Organismen untersucht wurden, ist bekannt, dass diese in einem Operon organisiert sind und einer gemeinsamen Regulation unterliegen. Für *acrA/B* aus *E. amylovora* wird dies ebenfalls

angenommen (Grkovic et al., 2002). Auf mögliche Regulationsmechanismen wird in einem späteren Abschnitt eingegangen.

Aufgrund der Sequenzanalyse des Operons aus *E. amylovora*, kodiert *acrA* für ein periplasmatisches und *acrB* für ein transmembranales Protein. Basierend auf dieser Analyse kann das periplasmatische Protein AcrA der ‚membrane fusion protein‘ (MFP)-Familie zugeordnet werden (Dinh et al., 1994). Diese Familie umfasst Lipoproteine Gram-negativer Bakterien, die mit einem Lipidrest in der Zytoplasmamembran verankert sind. Sie besitzen eine Signalpeptidsequenz am N-Terminus, die notwendig für einen Export ins Periplasma ist und nach erfolgter Translokation durch die Signalpeptidase II abgetrennt wird (Hayashi & Wu, 1990).

Des weiteren durchspannen MFPs aufgrund einer hydrophilen α -Helix-Region das Periplasma und können mit den β -Faltblattstrukturen im Carboxy-terminalen Bereich mit der äußeren Membran interagieren (Dinh et al., 1994). Mittels Computeranalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *acrA* aus *E. amylovora* konnten sowohl eine Signalpeptidsequenz als auch für MFPs typische Sekundärstrukturen, sowie die hydrophilen α -Helices und die β -Faltblattstrukturen, vorhergesagt werden.

Zusammen mit einem Transporter der Zytoplasmamembran und einem Porin-ähnlichen Protein der äußeren Membran, einem Vertreter der ‚outer membrane factor‘ (OMF)-Familie (Paulsen et al., 1997), vermitteln MFPs einen Substrattransport durch beide Membranen ins Medium. Dabei können sie mit zytoplasmatischen Transportern der ‚ATP binding cassette‘ (ABC)-, MF- und ‚resistance-nodulation-cell division‘ (RND)-Superfamilie interagieren (Dinh et al., 1994). AcrA aus *E. amylovora* hat signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen, die mit Multidrug-Efflux-Transportern der RND-Familie wechselwirken (Tseng et al., 1999).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *acrB*, dem stromabwärts von *acrA* gelegenen Gen, ist signifikant ähnlich zu den Multidrug-Efflux-Proteinen der RND-Familie aus Gram-negativen Bakterien (Poole, 2001a). Für die Aminosäuresequenz von AcrB aus *E. amylovora* konnte durch die Erstellung einer computergestützten Hydropathie-Kurve ein Topologiemodell vorhergesagt werden. Demnach besitzt AcrB 12 transmembranale α -Helices. Zwischen α -Helix 1 und 2 sowie zwischen α -Helix 7 und 8 ragt jeweils eine etwa 260 Aminosäurereste umfassende hydrophile Domänen ins Periplasma. Diese Topologie ist typisch für RND-Proteine, wurde bisher von Guan et al. (1999) für MexB, von Gotho et al. (1999) für MexD und von Fujihira et al. (2002) für AcrB verifiziert.

Multidrug-Efflux-Proteine der RND-Familie besitzen ein breites Substratspektrum (Poole, 2000; 2001). Es umfasst sowohl lipophile, amphiphile und hydrophile Verbindungen. Die Transporter können ihr Substrat zusammen mit einem MFP und einem OMF in einem, durch einen H^+ /Substrat-Antiport gekoppelten Schritt aus der Zelle schleusen. Wie die drei Komponenten miteinander interagieren, um diesen Export zu ermöglichen, ist bisher nicht genau geklärt. Untersuchungen in dieser Hinsicht wurden insbesondere an dem Transportsystem AcrAB aus *E. coli* und MexAB aus *Pseudomonas aeruginosa* gemacht (Lomovskaya et al, 2002; Nikaido & Zgurskaya, 2001; Poole, 2001b).

Mit Hilfe der Kristallstruktur, die von Murakami et al. (2002) mit einer Auflösung von 3,5 Å für AcrB aus *E. coli* bestimmt wurde, konnten Aussagen über die Funktionsweise dieses Proteins gemacht werden. AcrB liegt als Homotrimer aktiv vor, welches drei Domänen unterschiedlicher Funktion besitzt. Die transmembranale Domäne wird von den 12 α -Helices eines jeden Monomers gebildet. Entsprechend den Ergebnissen einer ortsspezifischen Mutagenese, die Guan & Nakae (2001) an MexB durchführten, befinden sich in der Transmembrandomäne, in der vierten und zehnten α -Helix Aminosäurereste, die für die Funktion des Transportproteins essentiell sind. Sie sind in Sequenzbereichen lokalisiert, die in der RND-Familie konserviert vorliegen. In MexB sind Asp₄₀₇, Asp₄₀₈ und Lys₉₄₀ für die Translokation der Protonen während des H^+ /Substrat-Antiports zuständig. In AcrB aus *E. amylovora* sind diese Aminosäurereste ebenfalls konserviert und erfüllen möglicherweise dieselben Aufgaben.

Der periplasmatische Teil des AcrB- Homotrimers bildet die Poren-Domäne und die ‚TolC-docking‘-Domäne. Über die ‚TolC-docking‘-Domäne wird der Kontakt zu dem OMF, TolC, hergestellt (Koronakis et al., 2000). Das Substrat gelangt durch die Poren-bildende-Domäne über TolC ins umgebende Medium (Abb. 38). Das MFP AcrA ist essentiell für den Transportmechanismus. Es ist aber bisher noch nicht verstanden, wie das Protein mit den anderen beiden Komponenten interagiert. Des weiteren ist unbekannt, wo die Substratbindung erfolgt. Elkins & Nikaido (2002) und Tikhonova et al. (2002) zeigten für AcrB, AcrD und MexB, dass die periplasmatischen Domänen dieser Proteine für die Substratbindung eine wichtige Rolle spielen. Erschwert wird eine Erklärung nicht nur durch die Vielfalt der Verbindungen, sondern auch durch ihre Lokalisation. Es werden sowohl Substanzen aus dem Zytoplasma als auch aus dem Periplasma, wie z. B. β -Lactame, von AcrB und MexB transportiert (Li et al., 1994; Okusu et al., 1996). Murakami et al. (2002) entdeckten an der aufgelösten Kristallstruktur von AcrB Öffnungen, die zum einen Substrat aus dem Periplasma bzw. aus der äußeren Schicht der Membran und zum anderen Moleküle aus dem Zytoplasma

bzw. aus der inneren Schicht der Membran in den Proteinkomplex weiterleiten. Somit wird zu beiden Seiten der Membran eine Substraterkennung vermutet. Dies unterstützt das von Nikaido et al. (1998) postulierte ‚dual entrance model‘ der Substrattranslokation für AcrB.

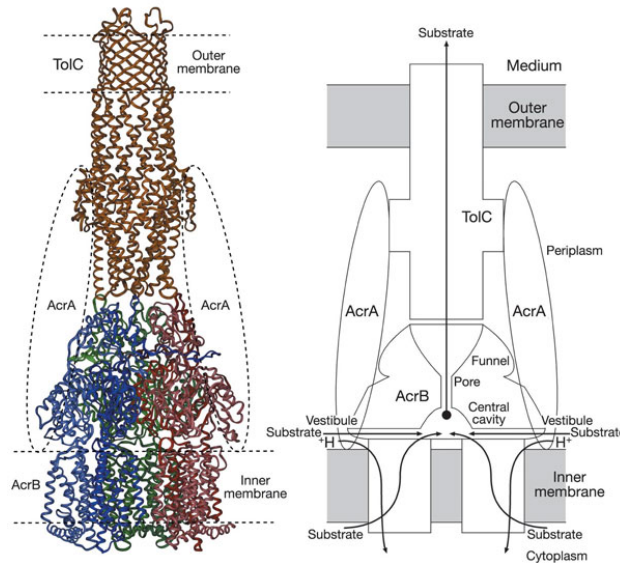


Abb. 38. Modell des AcrAB-TolC-Transportkomplex, erstellt durch die gelöste Kristallstruktur von AcrB. TolC wurde manuell hinzugefügt. Das Schema gibt den Mechanismus des Substratexports wider (Murakami et al., 2002).

Das Transportsystem AcrAB aus *E. amylovora* benötigt für einen Export von Verbindungen durch die äußere Membran einen OMF, der in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnte. Bei einigen Transportern ist das Gen, das den OMF kodiert in demselben Operon lokalisiert wie die Transporter-Gene, wie z. B. das OMF-Gen *oprM* mit *mexAB* in *P. aeruginosa* (Li et al., 1995) oder *mtrE* mit *mtrCD* in *Neisseria gonorrhoeae* (Hagmann et al., 1995). Im Gegensatz dazu sind OMF-Gene in Enterobakterien separat in einem anderen Bereich des Genoms lokalisiert, wie z. B. *tolC* in *E. coli* (Fralick, 1996). In der Umgebung des *acrAB*-Operons aus *E. amylovora* wurde kein ORF aufgefunden, der für einen potentiellen OMF dieses Transportsystems kodiert.

Das Transportsystem AcrAB aus *E. amylovora* besitzt mehr als 75% Sequenzähnlichkeit zu den charakterisierten Multidrug-Efflux-Pumpen AcrAB, AcrEF, YhiUV aus *E. coli*, AcrAB aus *Enterobacter aerogenes* sowie MexAB aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diese Pumpen vermitteln alle den Export eines breiten Spektrums an lipophilen und amphipilen Antibiotika, Farbstoffen sowie Detergenzien (Poole, 2001; van Bambeke, 2000). Um nachzuweisen, dass AcrAB ebenfalls zu den Multidrug-Efflux-Transportern zählt, wurde dessen Substratspektrum untersucht. Dafür erfolgte eine heterologe Expression von *acrAB* in dem, bereits für die Charakterisierung von *norM* verwendeten *E. coli*-Stamm KAM3 und die Überprüfung der Sensitivität einer *acrB*-Mutante von *E. amylovora* im Vergleich zum

Wildtyp. Die Substrattests wurden anhand der Bestimmung von minimalen Hemmkonzentrationen verschiedener Verbindungen durchgeführt.

Für AcrAB aus *E. amylovora* wurden Substrate identifiziert, die bereits von anderen charakterisierten Transportsystemen bekannt waren. Dazu zählten Tetracyclin, die Chinolon-Antibiotika Nalidixinsäure, Norfloxacin und Ciprofloxacin, die Farbstoffe Kristallviolett, Methylenblau, Ethidiumbromid, das Alkaloid Berberin und das Detergenz SDS. Aus der vorliegenden Arbeit ging weiterhin hervor, dass die im Periplasma wirkenden β -Lactame, Ampicillin und Carbenicillin, sowie die hydrophilen Aminoglycoside Spectinomycin und Gentamycin keine Substrate für AcrAB darstellen. Generell ist ein Aminoglycosid-Export bisher nur von wenigen Transportern der RND-Familie beschrieben, wie bei AcrD aus *E. coli* (Rosenberg et al., 2000), bei MexXY aus *P. aeruginosa* (Aires et al., 1999), bei AmrAB *Burkholderia pseudomallei* (Moore et al., 1999) und bei AdeABC aus *Acinetobacter baumannii* (Magnet et al., 2001). Diese Transporter scheinen spezifischer für Aminoglycoside als für andere Verbindungen zu sein. Das AcrAB-Transportsystem aus *E. amylovora* exportiert unterschiedliche lipophile und amphiphile Antibiotika, Farbstoffe und ein Detergenz. Es besitzt ein breiteres Substratspektrum im Vergleich zu NorM, das lipophile Kationen als Substrat bevorzugt, und spielt damit für die Multidrug-Resistenz des Pathogens eine wichtige Rolle.

Multidrug-Efflux-Proteine sind ubiquitär bei Prokaryoten verbreitet. *E. amylovora* gehört der Familie der *Enterobacteriaceae* an. In humanpathogenen Vertretern der Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Yersinia* wurden bereits Multidrug-Efflux-Transporter der RND- und MATE-Familie identifiziert (Paulsen et al., 2000; 2001). Aus der näheren Verwandtschaft von *E. amylovora* sind solche Proteine jedoch noch unbekannt. Es wurde mittels PCR- und Southernblot-Analyse die Verbreitung des *norM*- und *acrB*-Gens bei 19 *E. amylovora*-Stämmen sowie einigen verwandten, phytopathogenen Bakterienarten überprüft. Die *E. amylovora*-Stämme waren von unterschiedlicher geographischer Herkunft und wurden von unterschiedlichen Wirtspflanzen isoliert. Alle getesteten *E. amylovora*-Stämme ergaben mit von *norM* und *acrB* abgeleiteten Primern ein PCR-Signal der gleichen Größe. Dies unterstreicht die Beobachtung, dass *E. amylovora* in genetischer Hinsicht eine weitgehend homogene Art darstellt (Momol & Aldwinckle, 2000; Paulin, 2000). Für Bakterienstämme der näheren Verwandtschaft von *E. amylovora* konnte aufgrund der Spezifität der PCR-Methode kein PCR-Amplifikat erhalten werden. Deshalb wurden diese Stämme mittels Southernblot-Analyse untersucht. In weiteren 6 *Erwinia*-Arten und in allen getesteten Vertretern der Gattungen *Pantoea*, *Pectobacterium* und *Brenneria*

konnten *norM*- und *acrB*-ähnliche Gene nachgewiesen werden. Es kann gefolgert werden, dass sowohl bei human- als auch bei phytopathogenen Enterobakterien *norM* und *acrB*-ähnliche Gene weit verbreitet sind.

5.2 Einfluss von AcrAB und NorM auf die Pflanze-Pathogen-Interaktion

Die Bedeutung der Multidrug-Efflux-Proteine von *E. amylovora* bei der Ausbildung der Feuerbrandkrankung wurde anhand von *in planta*-Experimenten untersucht. Dafür wurden *norM*- und *acrB*-Mutanten mittels Marker-Austausch-Mutagenese erzeugt, wobei durch Integration einer Resistenzkassette das entsprechende Gen ausgeschaltet wurde. Die Virulenztests wurden an Apfelunterlagen der Sorte MM 106VF durchgeführt, so dass eine genetische Identität der Testpflanzen gewährleistet werden konnte. Eine Inokulation der Bakterien erfolgte mit der „Prick-Technik“ in die Triebspitze der Pflanzen.

Die Ermittlung der Überlebensrate nach 24 h Inkubation zeigte, dass die *acrB*-Mutante deutlich in ihrer Virulenz eingeschränkt ist. Dagegen verhält sich die *norM*-Mutante wie der Wildtyp. So musste von der *acrB*-Mutante eine mehr als 100fach höhere Zellzahl im Vergleich zu *norM*-Mutante und Wildtyp in die Triebe der Apfelpflanzen inokuliert werden, um eine Wiederfindung der Bakterien zu ermöglichen. Nach einer Inokulation von 10^2 und 10^3 cfu/Einstich konnten nach 24 h 10^3 bzw. 10^4 cfu/cm Stengel von *norM*-Mutante und Wildtyp re-isoliert werden. Für die *acrB*-Mutante mussten dagegen 10^4 cfu/Einstich eingesetzt werden, um 10^2 cfu/cm Stengel zu re-isolieren. Des weiteren wurden bei gleichem Inokulum jeweils 100fach weniger cfu/cm Stengel bei der *acrB*-Mutante ermittelt als bei *norM*-Mutante und Wildtyp. Erfolgte eine Inkubation der infizierten Apfelpflanzen über einen Zeitraum von 3 Wochen, wurde bei der *acrB*-Mutante nur eine schwache Ausprägung der für Feuerbrand typischen Symptome, wie Schleimproduktion und Nekrosen beobachtet. 15 Triebe wurden jeweils mit der *acrB*- und der *norM*-Mutante sowie mit dem Wildtyp infiziert. Durch die *acrB*-Mutante starb nur ein Trieb ab, während durch die *norM*-Mutante bzw. den Wildtyp jeweils 9 Triebe abstarben. Bei allen anderen Pflanzen traten keine sichtbaren Symptome auf. Daraus ergibt sich, dass die *acrB*-Mutante in ihrer Virulenz im Vergleich zum Wildtyp und der *norM*-Mutante deutlich eingeschränkt ist. Das Transportsystem AcrAB hat keinen Einfluss auf die Pathogenität von *E. amylovora*, spielt aber eine wichtige Rolle bei der Infektion und der Stärke der Krankheitsausprägung. Vermutlich werden antimikrobiell wirksame Pflanzeninhaltsstoffe durch AcrAB aus der Zelle geschleust, verlieren so ihre Wirkung und *E. amylovora* kann das Pflanzengewebe besiedeln. Bisher ist dies der erste

Hinweis, dass ein Multidrug-Efflux-Transporter bei einem phytopathogenen Bakterium als Virulenzfaktor fungiert.

Lediglich von dem symbiontischen Bakterium *Rhizobium etli* ist beschrieben, dass durch Mutation des MF-Transporters RmrAB 40% weniger Wurzelknöllchen an Buschbohne gebildet wurden (Gonzales-Passayo & Martinez-Romero, 2000). Da die Transporter-Mutante durch Phaseollin, Phaseollidin, Naringenin und Salicylsäure stärker inhibiert wurde als der Wildtyp, könnte die antimikrobielle Wirkung dieser Substanzen eine Ursache für die verminderte Knöllchenbildung sein. Aus einem *A. tumefaciens*-Stamm ist der RND-Transporter IfeAB bekannt, dessen Verlust eine schwächere Besiedlung der Wurzeln der Wirtspflanze in einem Wettbewerbsversuch mit dem Wildtyp verursachte (Palumbo et al., 1998).

In Pilzen wurde die Rolle von mehreren Multidrug-Efflux-Transportern der ABC-Familie bei der Infektion der Wirtspflanzen untersucht. Darunter befand sich eine *Gpabc1*-Mutante von *Gibberella pulicaris*, deren Wachstum auf Kartoffelknollen durch die Wirkung des antifungalen Phytoalexins Rishitin gehemmt wird (Fleißner et al., 2002). Für eine *BcatrB*-Mutante von *Botrytis cinerea* wurde eine verminderte Virulenz an Weinblättern nachgewiesen, was wahrscheinlich durch den antifungalen Effekt des Phytoalexins Resveratrol verursacht wird (Schoonbeek et al., 2001). Urban et al. (1999) beschrieben eine *ABC1*-Mutante von *Magnaporthe grisea* mit einer deutlich eingeschränkten Virulenz an Reispflanzen, was wahrscheinlich auf die Wirkung eines Phytoalexins zurückzuführen ist, das jedoch bisher nicht identifiziert werden konnte.

Könnte die verminderte Virulenz der *acrB*-Mutanten in Apfel auf die Existenz von Phytoalexinen in dieser Pflanzenart zurückzuführen sein? Phytoalexine sind niedermolekulare Verbindungen, die von der pflanzlichen Abwehr als Antwort auf einen Pathogenbefall gebildet werden (Dixon, 2001; Harborne, 1999). Es handelt sich dabei um Metabolite des Sekundärstoffwechsels, deren Enzyme durch Pathogenkontakt induziert werden können (Lamb & Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997). Aus Vertretern der *Rosaceae*-Familie sind bisher keine durch *E. amylovora* induzierbaren Phytoalexine bekannt, lediglich eine Induktion von Biphenylen und Dibenzofurane durch pilzliche Elicitoren wurde beschrieben (Grayer & Kokubun, 2001). Allerdings wurden in Apfel antimikrobiell wirksame Verbindungen identifiziert, die zu den Flavonoiden gehören und die konstitutiv von der Pflanze gebildet werden (Treutter, 2001).

Um die Wirkung solcher Verbindungen auf die *acrB*-Mutante und den *E. amylovora*-Wildtyp zu überprüfen, wurden methanolische Rohextrakte von Blättern von verschiedenen

Wirtspflanzen des Feuerbrandpathogens hergestellt, so von Apfel der Sorte MM 106VF und Klarapfel, von Birne, Quitte und Weißdorn.

Der Wildtyp war gegenüber allen getesteten Extrakten resistent. Demgegenüber wurde eine signifikante Wachstumshemmung der *acrB*-Mutante durch den Extrakt der Apfelsorte MM 106VF beobachtet. Kein Extrakt der anderen Pflanzenblätter verursachte eine solche Hemmung. Des weiteren wurden aus der Apfelsorte MM 106VF Extrakte überprüft, die aus Blättern von Zweigen hergestellt wurden, die Symptome einer *E. amylovora*-Infektion aufwiesen. Diese Extrakte besaßen dieselbe Hemmwirkung wie die von nichtinfizierten Pflanzen. Somit produziert die Apfelsorte MM 106VF konstitutiv Substanzen, die Substrate des AcrAB-Transportsystems darstellen. Mayr et al. (1995) ermittelten aus Blättern des Apfelkultivars ‚Golden Delicious‘ den Gehalt an phenolischen Sekundärmetaboliten. Dabei konnte ein hoher Gehalt des Dihydrochalkons Phloridzin (200-400 µM/g Trockenmasse (TM)) sowie der Quercetinglykoside (ca. 50 µM/g TM) nachgewiesen werden. Des weiteren wurden Chlorogensäure, das Flavonol Epicatechin und das oligomerische Flavanol Procyanidin B5 in Konzentrationen detektiert, die 1 µM/g TM nicht überschritten. Phloridzin und die Quercetinglykoside sind inaktive Verbindung, die in der Pflanze gespeichert und erst durch Abspaltung der Zuckerreste bei Gewebeverletzung oder Pathogenbefall als aktive Aglykone freigesetzt werden.

Ob diese Pflanzeninhaltsstoffe tatsächlich eine Hemmung der *acrB*-Mutante verursachen, wurde anhand von Tests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen durchgeführt. Es erfolgte eine Überprüfung von Phloretin, Quercetin, Naringenin, (+)-Catechin, Chlorogensäure und Protocatechonsäure aus Apfel, um das Phytoalexin Genistein aus Sojabohne und Salicylsäure. Die *acrB*-Mutante zeigte sich signifikant sensitiver als der Wildtyp. Mit Ausnahme von Chlorogensäure, Protocatechonsäure und Salicylsäure genügten 4-150fach geringere Konzentrationen der Substanzen, um eine Hemmung der *acrB*-Mutante zu erzeugen.

Der Befund, dass die *acrB*-Mutante gegenüber der Wirkung verschiedener Phytoalexine der Wirtspflanze sensitiv ist, führt zu der Vermutung, dass das AcrAB-Transportsystem bei der Resistenz gegenüber diesen Verbindungen und somit bei der Pflanze-Pathogen-Interaktion von Bedeutung sein könnte.

5.3 Regulation von AcrAB

Von einigen Virulenzfaktoren aus phytopathogenen Bakterien ist eine Induktion durch Sekundärmetabolite der pflanzlichen Abwehr bekannt (van Gijsegem, 1997). Nehmen solche Verbindungen auch Einfluss auf die Expression des Transportersystems AcrAB aus *E. amylovora*? Zur Klärung dieser Frage wurde die Promotoraktivität von *acrR* und *acrAB* mittels transkriptioneller Fusionen mit dem Reportergen *egfp* untersucht. Damit wurde die Änderung der Promotoraktivität von *acrR* und *acrAB*, durch die Testsubstanzen Phloretin, Quercetin, Naringenin, Berberin, Norfloxacin und Kristallviolett, anhand von Fluoreszenzmessungen bestimmt.

Der Promotor des *acrAB*-Operons wurde durch Phloretin und Naringenin mehr als 3fach induziert. Alle anderen Substanzen besaßen keinen induzierenden Effekt. Der Promotor von *acrR* zeigte eine 2 bis 2,5fach erhöhte Aktivität gegenüber allen getesteten Substraten, außer Kristallviolett. Jedoch mussten für eine Induktion der Genexpression von *acrAB* und *acrR* Substanzkonzentrationen eingesetzt werden, die eine beginnende wachstumshemmende Wirkung besaßen. Es kann nicht eindeutig unterschieden werden, ob der induzierende Effekt auf der Anwesenheit der Substanz selbst oder auf einem unspezifischen Stresssignal beruht. Eine Ausnahme bildet Phloretin, das auch bei nicht-wachstumshemmenden Substratkonzentrationen die Genexpression von *acrAB* 3fach und von *acrR* 2fach induzierte. Salicylsäure wurde ebenfalls getestet, da in der Literatur ein Einfluss auf eine erhöhte Multidrug-Resistenz bei *E. coli* beschrieben wurde (Cohen et al., 1993; Price et al., 2000). Nur bei der *acrAB::egfp*-Fusion konnte nach Zugabe von Salicylsäure eine 2fach erhöhte Fluoreszenz ermittelt werden. Für die *acrR::egfp*-Fusion wurde dies nicht beobachtet. Von den untersuchten Verbindungen war also nur Phloretin in der Lage, die *acrAB*- und *acrR*-Genexpression zu induzieren. Phloretin liegt in Apfelpflanzen in hoher Konzentration vor. Es dient den Bakterien scheinbar als ein Signal, sich *in planta* durch eine gesteigerte Expression des AcrAB-Transporters gegen die hohen Konzentrationen von Phytoalexinen zu schützen.

Von AcrAB-verwandten RND-Proteinen sind bisher nur Induktionen durch Substrate bekannt, die auch in der natürlichen Umgebung der Bakterien auftreten. So sind beispielsweise die Darmbewohner *E. coli* und *N. gonorrhoeae* in ihrer natürlichen Umgebung Gallen- und Fettsäuren ausgesetzt. Von *E. coli* ist eine Resistenz gegenüber solchen Verbindungen durch AcrAB und eine 2fache Induktion der *acrAB*-Genexpression durch Caprinsäure bekannt (Ma et al., 1995). Von *N. gonorrhoeae* ist eine 4fache Induktion von *mtrCDE* durch das hydrophobe Detergenz Triton-X100 bekannt, das eine ähnliche Wirkungsweise wie die natürlich vorkommenden Agentien besitzt (Rouquette et al., 1999).

Der *Pseudomonas putida*-Stamm DOT-T1E ist an ein Überleben in einer Umgebung mit organischen Lösungsmitteln angepasst. Eine Toleranz gegenüber diesen Verbindungen wird durch Transportsysteme erworben, deren Expression z. B. durch Toluol induziert werden kann (Duque et al., 2001). Bisher ist ein einziger Vertreter der RND-Familie bei einem pflanzenassoziierten Bakterium mit induzierter Genexpression bekannt. Es handelt sich dabei um das bereits erwähnte IfeAB aus *Agrobacterium tumefaciens*. Eine *ifeA::gusA*-Fusion ergab Induktionen durch die Luzerne-Isoflavonoide Coumestrol (10fach), Medicarpin (17fach), Formononetin (3fach), die Sojabohnen Isoflavonoide Genistein (15fach), Daidzein (16fach) und Biochanin-A (4fach) sowie durch 4,4'-Dihydroxy-2'-methoxychalcon (10fach) (Palumbo et al., 1998).

Des weiteren wurde eine Transkriptionsinduktion von *acrAB* und *acrR* im Verlauf des Wachstums in Flüssigkultur und bei den Temperaturen 18°C und 28°C untersucht. Eine temperaturregulierte Genexpression konnte weder für *acrAB* noch für *acrR* nachgewiesen werden. Anhand der Wachstumskurve wurde beobachtet, dass *acrR* eine etwa 2fach schwächere Promotoraktivität als *acrAB* während aller Wachstumsphasen besitzt. Zu Beginn der Stationärphase erhöhte sich die EGFP-Fluoreszenz der *acrR* und *acrAB*-Fusionen etwa 2fach. Ma et al. (1995) beschrieben für *acrAB* aus *E. coli* anhand von β -Galactosidase-Fusionen, einen 2,5fachen Anstieg der Promotoraktivität bei Eintritt in die Stationärphase. Für das *mexAB*-Operon, das für einen RND-Transporter aus *Pseudomonas aeruginosa* kodiert, wurde eine 6fach erhöhte Promotoraktivität mittels Fusionen mit alkalischer Phosphatase in der Stationärphase nachgewiesen (Evans & Poole, 1999). Allerdings muss bei der Betrachtung der Ergebnisse beachtet werden, dass es bei einer konstitutiven Expression der Reporterproteine, aufgrund ihrer Stabilität, zu einer Anreicherung in den Zellen kommen kann.

Des weiteren wurden von Ma et al. (1995) eine 5fach erhöhte β -Galactosidase-Aktivität des *acrAB*-Promotors unter Salzstress (0,5 M NaCl) beschrieben. Dies konnte jedoch bei *acrAB* und *acrR* in *E. amylovora* nicht nachgewiesen werden. Bisher kann gefolgert werden, dass AcrR und AcrAB weder durch Salzstress noch durch Temperatur, allerdings zu Beginn der Stationärphase und durch das Phytoalexin Phloretin induziert sind.

Welche Rolle spielt AcrR bei der Regulation des *acrAB*-Operons in *E. amylovora*? Da keine *acrR*-Mutante hergestellt wurde, kann lediglich aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu dem entsprechenden Protein aus *E. coli* vermutet werden, dass es sich bei AcrR aus *E. amylovora* ebenfalls um einen Repressor handelt. Da die Genexpression von *acrR* ebenso wie die von *acrAB* in der Stationärphase und durch Phloretin erhöht war, wird, durch die

koordinierte Expression des Repressors zusammen mit AcrAB, eine letale Überexpression des Transporters verhindert. Aus *E. coli* ist der Einfluss von globalen Regulatoren, wie MarA, SoxS und Rob, auf die Expression von *acrAB* bekannt, wobei AcrR eine modulierende Funktion übernimmt (Ma et al., 1996). Von MarA und SoxS ist bekannt, dass sie die Expression von Genen regulieren, die einen Einfluss auf die Resistenz der Zelle gegenüber Antibiotika und reaktiven Sauerstoffspezies haben (Aleksun & Levy, 1999; Miller & Sulavik, 1996). Das *mar*-Operon ist innerhalb der Enterobakterien weit verbreitet und es ist nicht auszuschließen, dass es auch in *E. amylovora* eine zentrale Rolle spielt.

Die Multidrug-Efflux-Pumpe AcrAB aus dem phytopathogenen Bakterium *E. amylovora* ist ein Virulenzfaktor, der durch ein Pflanzensignal induziert werden kann. Dies wurde bisher nur bei wenigen ABC-Transportern mit ähnlicher Funktion aus Pilzen nachgewiesen. Beispielsweise spielen BcatrB aus *Botrytis cinerea* und ABC1 aus *Magnaporthe grisea* bei der Virulenz eine Rolle und deren Transkription wird durch Phytoalexine, wie Resveratrol bzw. Sakuranetin induziert (Schoonbeek et al., 2001; Urban et al., 1999). Von den ABC-Transportern PMR1 und PMR5 aus *Penicillium digitatum* konnte noch kein Einfluss auf die Virulenz, aber interessanterweise eine Transkriptionsinduktion u. a. durch Phloretin beschrieben werden (Nakaune et al., 2002). Aus Bakterien sind andere Virulenzgene bekannt, wie die *vir*-Gene des Ti-Plasmids von *A. tumefaciens*, die durch pflanzliche Signale induziert werden. Diese Gene kodieren für die Bestandteile eines Pilus, durch den der T-DNA-Transfer in den Nukleus der Pflanzenzelle erfolgt (Typ IV-Sekretion) (Kado, 2000). Die Induktion der *vir*-Gene durch phenolische Verbindungen, wie z. B. Acetosyringon, und bestimmte Monosaccharide der Pflanze ist ein wichtiger Schritt für die Etablierung einer *A. tumefaciens*-Population in der Pflanze. Für die chemische Signalaufnahme konnte ein Zwei-Komponenten-System, VirA/G, verantwortlich gemacht werden, wobei die Sensor kinase VirA über periplasmatische Loops mit den entsprechenden Signalmolekülen pflanzlichen Ursprungs interagiert (Winans et al., 1994). Mo und Gross (1990) untersucht eine Induktion der Biosynthese des Phytotoxins Syringomycin durch pflanzliche, phenolische Glykoside in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Des weiteren ist eine *in planta*-Induktion von Zellwand-abbauenden Pektatlyasen aus *Pectobacterium chrysanthemi* sowie von *hrp*- und *avr*-Genen aus einigen Phytopathogenen bekannt (van Gijsegem, 1997).

5.4 Einfluß von AcrAB und NorM auf die Interaktion mit anderen Mikroorganismen

Für NorM, einen sekundären Transporter aus der MATE-Familie, konnte bei *in planta*-Experimenten kein Einfluß auf die Virulenz des Pathogens *E. amylovora* nachgewiesen werden. Es wurden jedoch Hinweise auf eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Mikroorganismen während des epiphytischen Wachstums gefunden. Für viele phytopathogene Bakterien ist das Erreichen einer hohen Zellzahl auf der Pflanzenoberfläche eine wichtige Voraussetzung, um die pflanzliche Abwehr zu durchbrechen und die Pflanze erfolgreich zu infizieren. *E. amylovora* besiedelt vor allem die Blüte, wo das Bakterium im Vergleich zu anderen Pflanzenteilen hohe Populationsdichten erreicht (Miller, 1984; Thomson, 1986). Dies stellt nicht nur eine wichtige Voraussetzung für die primäre Infektion der Pflanze dar, die meist über den Blütenboden erfolgt (Wilson et al., 1989a; 1989b), sondern sichert auch die weitere Verbreitung des Pathogens durch blütenbesuchende Insekten (Emmet & Baker, 1971). Für die Etablierung einer hohen Pathogenpopulation spielt die Konkurrenz mit anderen Epi- und Saprophyten um Raum- und Nahrungsressourcen eine wesentliche Rolle. Es ist bekannt, dass viele von Pflanzenoberflächen isolierte Mikroorganismen in der Lage sind, Antibiotika zu produzieren. Der Multidrug-Efflux könnte ein Resistenzmechanismus der Pathogene gegen diese antimikrobiellen Verbindungen darstellen.

Die Bedeutung der Multidrug-Efflux-Transporter in der Interaktion von *E. amylovora* mit anderen Mikroorganismen wurde anhand von epiphytischen Isolaten aus der Blüte untersucht. Diese Isolate wurden von unterschiedlichen Wirtspflanzen, wie Apfel, Birne, Quitte und Weißdorn, gewonnen. Die Probenahme erfolgte in der Mitte der Blütezeit. Durch den Einsatz von LB-Medium wurden hauptsächlich Bakterien isoliert und nur wenige Pilze bzw. Hefen. Eine Antibiotika-Produktion dieser Isolate wurde mittels Agardiffusionstests überprüft. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum der *norM*-Mutante im Vergleich zu *acrB*-Mutante und Wildtyp durch mehrere Isolate deutlich gehemmt wurde. Von 70 in Flüssigmedium inkubierten Isolaten, inhibierten 18 die *norM*-Mutante signifikant. Nur 5 dieser Kulturüberstände hemmten alle drei Testorganismen gleichermaßen und 4 hemmten die *acrB*-Mutante stärker als die *norM*-Mutante und den Wildtyp. 43 Isolate produzierten in diesem Medium keine antimikrobiellen Substanzen.

Alle Isolate mit einer inhibitorischen Wirkung auf die *norM*-Mutante sind gelb pigmentiert und bilden dieselbe Kolonieform, so dass sie vermutlich einer Bakterien-Art zugeordnet werden können. Je ein Vertreter der Isolate einer Pflanze wurde für eine 16S rRNA-Analyse

ausgewählt. Die Ergebnisse zeigten, dass diese der Art *Pantoea agglomerans* angehören. *P. agglomerans* ist ein weit verbreiteter Epiphyt, der als potentieller Antagonist zur biologischen Kontrolle des Feuerbrandpathogens untersucht wird. Einerseits konnte bereits gezeigt werden, dass *P. agglomerans* denselben Lebensraum besiedelt wie *E. amylovora* und mit dem Pathogen um Raum- und Nahrungsressourcen konkurriert (Hattingh et al., 1986). Andererseits zeichnen sich viele Stämme dieser Art durch die Produktion von Antibiotika aus (Ishimaru et al., 1988; Wright et al., 2001). Durch antagonistischen Mechanismen kann das Pathogen verdrängt bzw. in seiner Vermehrung eingeschränkt und somit die Infektion einer Pflanze verhindert werden. Die *norM*-Mutante von *E. amylovora* wurde durch ein Toxin der *P. agglomerans*-Stämme inhibiert. Da der Epiphyt und das Pathogen im selben Habitat vorkommen können, hat sich möglicherweise durch koevolutive Prozesse in *E. amylovora* ein Resistenzmechanismus gegen die Toxine von *P. agglomerans* in Form des Multidrug-Efflux-Transporters NorM entwickelt.

Aber zu welcher Substanzklasse gehört dieses Toxin? Die Antibiose durch *P. agglomerans* wird hauptsächlich durch peptidische Verbindungen oder β -Lactame verursacht (Kearns & Mahanty, 1998; Vanneste et al., 1992; Wright et al., 2001). Die Struktur wurde bisher jedoch nur von den Peptiden Herbicolin A und B sowie Pantocin B aufgeklärt (Brady et al., 1999; Winkelmann et al., 1980). Viele antimikrobiell wirksame Metabolite von *P. agglomerans*-Stämmen können auf der Basis ihrer Inaktivierung durch Zugabe von Aminosäuren klassifiziert werden (Wodzinski & Paulin, 1994). Häufig werden Antibiotika produziert, deren Aktivität durch L-Histidin oder durch L-Histidin und L-Leucin aufgehoben werden kann (Wodzinski & Paulin, 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte die Wachstumshemmung der *norM*-Mutante durch die *P. agglomerans*-Blütenisolate bei allen untersuchten Stämmen durch L-Histidin aufgehoben werden.

Bisher wurden nur wenige Antibiotika von *P. agglomerans*, die in die Histidin-Biosynthese eingreifen, näher charakterisiert. Dazu zählen Pantocin A aus Stamm Eh318 (Wright et al., 2001), *mccEh252* aus Isolat Eh225 (Vanneste et al., 1992) und Hebicolin O aus Stamm C9-1 (Ishimaru et al., 1988; <http://www.colostate.edu/Depts/AES/projs/635.htm>). Allerdings konnte noch von keiner dieser Verbindungen die Struktur aufgeklärt werden. Von *mccEh252* aus Stamm Eh225 wurde, basierend auf einer Inaktivierung durch Proteinase-Behandlung, angenommen, dass es sich um ein Peptid handelt (Vanneste et al., 1992). Wright et al. (2001) vermuten aufgrund physikochemischer Eigenschaften, dass Pantocin A ebenfalls ein Peptid ist. Alle drei Substanzen besitzen ein Molekulargewicht von <3000 Da. Außerdem wurden mittels Southernblot-Analysen ähnliche, für die Toxinbildung notwendige, Gene in

den Stämmen Eh318, Eh252 und C1-9 festgestellt, so dass Pantocin A, mccEh252 und Herbicolin O wahrscheinlich strukturell verwandte Verbindungen darstellen. Es wird vermutet, dass die Toxine, die die *norM*-Mutante inhibieren, aufgrund der Aufhebung durch L-Histidin ebenfalls zu dieser Gruppe gehören.

Um Informationen über den genetischen Hintergrund der Synthese der wachstumshemmend wirkenden Verbindungen aus *P. agglomerans* zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Transposon-Mutanten des Stammes 2b/89 erzeugt. Es konnten Toxin-negative Mutanten isoliert werden, die das Transposon auf einem ihrer natürlichen Plasmide trugen. Es gibt verschiedene *P. agglomerans*-Stämme, bei denen sich die Biosynthese-Gene für Antibiotika auf einem Plasmid befinden. Dagegen wurden die Gene für Pantocin A, mccEh252 und Herbicolin O im Chromosom nachgewiesen (Wright et al., 2001). Aus einer Transposon-Mutante wurde eine 500 bp umfassende Nukleotidsequenz aus der Umgebung des Transposons sequenziert. Es konnten jedoch keine Ähnlichkeiten zu Genen aus den verfügbaren Datenbanken ermittelt werden. Somit bleibt die Aufklärung der Biosynthese-Gene der Hemmsubstanz Gegenstand nachfolgender Untersuchungen. Von Pantocin A aus Eh318 ist bereits bekannt, dass sich die Biosynthese-Gene in einer etwa 7,5 kb-umfassenden DNA-Region befinden. In Eh252 sind die Biosynthese-Gene für mccEh252 in einer 2,2 kb-Region lokalisiert. Eine Sequenz liegt bisher von keiner der beiden Regionen vor.

Es wurde gezeigt, dass NorM eine Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Verbindungen aus *P. agglomerans*-Stämmen vermittelt. Dieser Transporter könnte während der epiphytischen Wachstumsphase von *E. amylovora* in der Interaktion mit anderen Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen und damit auf die Infektion der Pflanze einen Einfluss haben. NorM zeigt eine erhöhte Expression bei niedrigen Temperaturen (18°C). Da die Besiedlung der Wirtspflanzen durch *E. amylovora* im Frühjahr bei kühler, feuchter Witterung erfolgt, könnte dieses Expressionsmuster durch die klimatischen Anforderungen einer erfolgreichen Infektion begründet sein.

Llama-Palacios et al. (2002) untersuchten die Bedeutung des ABC-Transporters YbiT aus dem Erreger der Nassfäule *Pectobacterium chrysanthemi* in der Konkurrenz mit Epiphyten. YbiT besitzt Ähnlichkeit zu Makrolid-Resistenz vermittelnden Transportern aus *Streptomyces* spp. In Co-Inokulierungsexperimenten mit epiphytischen Bakterien war die *ybiT*-Mutante deutlich bei der Besiedlung von Kartoffelknollen eingeschränkt und wurde von den Epiphyten verdrängt.

5.5 Ausblick

In zukünftigen Experimente sollte die Charakterisierung des NorM-Transporters vertieft werden. Weiterhin sollte die Rolle des Transporters in der Interaktion mit dem Epiphyten *P. agglomerans in planta* untersucht werden. Dafür wäre die Erfassung von Überlebensraten nach Co-Inokulation der Mutante sowie des *E. amylovora*-Wildtyps mit dem Epiphyten in Apfelpflanzen notwendig. Des weiteren soll eine Beobachtung der Populationsdynamik *in planta* mittels GFP-markierter Stämme erfolgen. Ein wichtiger Punkt in Bezug auf NorM wäre die Identifizierung der antimikrobiellen Substanz der *P. agglomerans*-Stämme. Die Gewinnung einer entsprechenden aufgereinigten Substanz könnte eine bessere Untersuchung des Transportmechanismus von NorM zulassen. Zudem sollte der genetische Hintergrund der Biosynthese dieser Substanz in *P. agglomerans* aufgeklärt werden.

Hinsichtlich des AcrAB-Transporters wäre eine Untersuchung der Induktion der Genexpression *in planta* von Bedeutung. Dafür sollen die bereits hergestellten *egfp*-Reportergenfusionen der *acrAB*- und *acrR*-Gene eingesetzt werden. Eine Quantifizierung würde mit Hilfe der Konfokalen-Laserscanning-Mikroskopie erfolgen. Des weiteren wären weiterführende Studien zur Regulation des *acrAB*-Operons durch den Einfluss von AcrR sowie globaler Regulatorproteine von Interesse.

All diese in der Zukunft geplanten Experimente werden unser biochemisches und mikrobiökologisches Verständnis von der Rolle der Multidrug-Efflux-Pumpen im Feuerbrandpathogen verbessern helfen.

6 LITERATUR

- Agrios, G. N. (1997). *Plant Pathology* (Press, A., Ed.), Hartcourt Brace & Company, San Diego.
- Aires, J. R., Kohler, T., Nikaido, H. & Plesiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2624-8.
- Aires, J. R., Pechere, J. C., Van Delden, C. & Köhler, T. (2002). Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2169-73.
- Aldridge, P., Metzger, M. & Geider, K. (1997). Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 611-619.
- Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (1999). The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* **7**: 410-413.
- Alfano, J. R. & Collmer, A. (1997). The typ III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* **179**: 5655-5662.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andrade, A. C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J. G. M. & De Waard M. A. (2000). The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and some natural toxic compounds. *Microbiology* **146**: 1987-1997.
- Andersen, J. B., Sternberg, C., Poulsen, L. K., Bjorn, S. P., Givskov, M. & Molin, S. (1998). New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2240-2246.
- Aramaki H., Yagi N. & Suzuki M. (1995) Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng.* **8**: 1259-66.
- Avila-Sakar, A. J., Misaghi, S., Wilson-Kubalek, E. M., Downing, K. H., Zgurskaya, H. I., Nikaido, H. & Nogales, E. (2001). Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. *J. Struct. Biol.* **136**: 81-88.
- Baron, C., Domke, N., Beinhofer, M. & Hapfelmeier, S. (2001). Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-pilus formation in

- different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. J. Bacteriol. **183** : 6852-61.
- Beer S. V. & Norelli, J. L. (1977). Fire blight epidemiology - factors affecting release of *Erwinia amylovora* by cankers. Phytopathology **67**: 741-742.
- Bellemann P. & Geider, K. (1992). Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. J. Gen. Microbiol. **138**: 931-940.
- Bengoechea J. A. & Skurnik, M. (2000). Temperature-regulated efflux pump/potassium antiporter system mediates resistance to cationic antimicrobial peptides in *Yersinia*. Mol. Microbiol. **37**: 67-80.
- Bereswill, S. & Geider, K. (1997). Characterization of the *rscB* gene from *Erwinia amylovora* and its influence on exopolysaccharide synthesis and virulence of the fireblight pathogen. J. Bacteriol. **179**: 1354-1361.
- Bereswill, S., Jock, S., Aldridge, J., Janse, D. & Geider, K. (1997). Molecular characterization of natural *E. amylovora* strains deficient in levan synthesis. Physiol. Mol. Plant Pathol. **51**: 215-225.
- Bernhard, F., Poetter, K., Geider, K. & Coplin, D. L. (1990). The *rscA* gene from *Erwinia amylovora*: identification, nucleotide sequence, and regulation of exopolysaccharide biosynthesis. Mol. Plant-Microbe Interact. **3**: 429-437.
- Blee E. (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. Prog. Lipid. Res. **37**: 33-72.
- Bogdanove, A. J., Kim, J. F. & Beer, S. V. (2000). Disease-specific genes of *Erwinia amylovora*: keys to understanding pathogenesis and potential targets for disease control. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 163-177.
- Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C. & Geider, K. (1998). Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, labeled with genes for bioluminescence and fluorescence. Phytopathology **88**: 416-421.
- Bogs, J. & Geider, K. (2000). Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. J. Bacteriol. **182**: 5351-5358.
- Bonas, U. & van den Ackerveken, G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial disease? Plant J. **12**: 1-8.

- Bonn, W. G. & van der Zwet, T. (2000). Distribution and economic importance of fire blight. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 37-53.
- Borjesza-Wysocki, W., Lester, C., Attygalle, A. B. & Hrazdina, G. (1999). Elicited cell suspension cultures of apple (*Malus x domestica*) cv. Liberty produce biphenyl phytoalexins. *Phytochemistry* **50**: 231-235.
- Bowles, D. J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 873-907.
- Brady, S. F., Wright, S. A., Lee, J. C., Sutton, A. E., Zumoff, C. H., Wodzinski, R. S., Beer, S. V. & Clardy, J. (1999). Pantocin B, an antibiotic from *Erwinia herbicola* discovered by heterologous expression of cloned genes. *J. Am. Soc.* **121**: 11912-11913.
- Brown, M.H., I.T. Paulsen, and R.A. Skurray. (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol. Microbiol.* **31**: 394-395.
- Brown, M. H. & Skurray, R. A. (2001). Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 163-70.
- Bucher P. & Bairoch A. (1994). A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; *Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., pp53-61, AAAIPress, Menlo Park.
- Bugert, P. & Geider, K. (1995). Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide biosynthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol. Microbiol.* **15**: 917-933.
- Burr, T. J., Norelli, J. L., Reid, C. L., Capron, L. K., Nelson, L. S., Aldwinckle, H. S. & Wilcox, W. F. (1993). Streptomycin-resistant bacteria associated with fire blight infections. *Plant Disease* **77**: 63-66.
- Burrill, T. J. (1883). New species of *Micrococcus*. *Am. Naturalist.* **17**: 319.
- Chatterjee, A., Chun, W. & Chatterjee, A. K. (1990). Isolation and characterization of an *rcsA*-like gene of *Erwinia amylovora* that activates extracellular polysaccharide production in *Erwinia* species, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 144-148.
- Chen, H. Y., Yuan, M. & Livermore, D. M. (1995). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in the UK in 1993. *J. Med. Microbiol.* **43**: 300-309.

- Chen, J., Morita, Y., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (2002). VmrA, a member of a novel class of Na(+)-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. **184**: 572-576.
- Chiou, C.-S. & Jones A. L. (1993). Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **175**: 732-740.
- Chiou, C.-S. & Jones A. L. (1995a). Molecular analysis of of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. Phytopathology **85**: 324-328.
- Chiou, C.-S. & Jones A. L. (1995b). Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. Gene **152**: 47-51.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 2110-4.
- Cohen, S. P., Levy, S. B., Foulds, J. & Rosner, J. L. (1993). Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. J. Bacteriol. **175**: 7856-7862.
- Coleman, M., Pearce, R., Hitchin, E., Busfield, F., Mansfield, J. W. & Roberts, I. S. (1990). Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the *rcaA* gene of *Erwinia amylovora*, encoding a positive regulator of capsule expression: evidence for a family of related capsule activator proteins. J. Gen. Microbiol. **136**: 1799-806.
- Colhoun, J. (1973). Effects of environmental factors on plant disease. Ann. Rev. Phytopathol. **11**: 343-364.
- Davis, D. R., McAlpine, J. B., Pazoles, C. J., Talbot, M. K., Alder, E. A., White, C., Jonas, B. M., Murray, B. E., Weinstock, G. M. & Rogers, B. L. (2001). *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**: 179-84.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J. Bacteriol. **172**: 6568-72.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature **394**: 585-8.
- Del Sorbo, G., Andrade, A. C., Van Nistelrooy, J. G. M., Van Kan, J. A., Balzi, E. & De Waard, M. A. (1997). Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. Mol. Gen. Genet. **254**: 417-426.

- Del Sorbo, G., Schoonbeek, H.-J. & De Waard, M. A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Gen. Biol.* **30**: 1-15.
- Denning, W. (1794). On the decay of apple trees. New York Society for the Promotion of Agricultural Arts and Manufacturers Transaction **2**: 219-222.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (1991) Medizinische Mikrobiologie - Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika - MHK der Testsubstanzen bei Kontrollstämmen für die Mikrodilution. DIN 58940, Teil 8, Beiblatt 1. Berlin: Beuth Verlag.
- Diener, A. C., Gaxiola, R. A. & Fink, G. R. (2001). Arabidopsis ALF5, a multidrug efflux transporter gene family member, confers resistance to toxins. *Plant Cell* **13**: 1625-1637.
- Dinh, T., Paulsen, I T. & Saier, M. H., Jr. (1994). A family of ectacytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**: 3825-3831.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- Duque, E., Segura, A., Mosqueda, G. & Ramos, J. L. (2001) Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **39**:1100-6.
- Eastgate, J. A., Tayler, N., Coleman, M. J., Healy, B., Thompson, L. & Roberts, I. S. (1995). Cloning, expression and characterization of the *lon* gene of *Erwinia amylovora*: Evidence for a heat shock response. *J. Bacteriol.* **177**: 932-937.
- Eastgate, J. A. (2000). *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fire blight disease. *Mol. Plant Pathol.* **1**: 325-329.
- Ebel, J. & Mithöfer, A. (1998). Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335-348.
- Eberhardt, S. M. R., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T. & Bacher, A. (1996). Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the *ribC* gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **242**: 712-719.
- Eden-Green, S. J. & Billing, E. (1974). Fireblight. *Rev. Plant Pathol.* **46**: 594-599.
- Elkins, C. A. & Nikaido, H. (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* **184**: 6490-8.
- Emmet, B. J. & Baker L. (1971). Insect transmission of fire blight. *Plant Pathol.* **20**: 41-45.

- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. & Somssich, I. E. (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* **18**: 4689-99.
- Evans, K. & Poole, K. (1999). The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 35-9.
- Expert, D., Dellagi, A. & Kachadourian, R. (2000). Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferroxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 179-195.
- Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J., Hofmann, K. & Bairoch, A. (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* **30**: 235-238.
- Feys, B. J. & Parker, J. E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* **16**: 449-55.
- Fischer, D., Barret, C., Bryson, K., Elofsson, A., Godzik, A., Jones, D., Karplus, K.J., Kelley, L.A., Maccallum, R.M., Pawowski, K., Rost, B., Rychlewski, L. and Sternberg, M.J. (1999). CAFASP-1: Critical Assessment of Fully Automated Structure Prediction Methods. *Proteins: Structure, Function and Genetics, Suppl* **3**: 209-217.
- Fleißner, A., Sopalla, C. & Weltring K.-M. (2002). An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 102-108.
- Flor, H. H. (1971). Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.
- Fujihira, E., Tamura, N. & Yamaguchi, A. (2002). Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **131**: 145-151.
- Fralick, J. A. (1996). Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 5803-5805.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M. & Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers (Peptide Science)* **47**: 479-491.
- Garcia-Olmedo, F., Rodriguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., Lopez-Sonilla, E. Berrocal-Lobo, M. & Poza-Carrion, C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Letters* **498**: 219-222.
- Gaudriault, S., Malandrin, L., Paulin, J.,P. & Barny, M. A. (1997). DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas*

- syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. Mol. Microbiol. **26**: 1057-69.
- Geider, K., Hohmeyer, C. Haas, R. & Meyer, T. F. (1985). A plasmid cloning system utilizing replication and packaging functions of filamentous bacteriophage fd. Gene **33**: 341-349.
- Geider, K. (2000). Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 117-140.
- Gonzales-Pasayo, R. & Martinez-Romera, E. (2000). Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. Mol. Plant-Microbe Interact. **13**: 572-577.
- Gotho N., Kusumi, T., Tujimoto, H., Wada, T. & Nishino, T. (1999). Topological analysis of an RND family transporter, MexD of pseudomonas aeruginosa. FEBS Letter **458**: 32-36.
- Goyer, C. & Ullrich, M. S. (1999). Thermoregulation of virulence gene expression in the Fire Blight pathogen *Erwinia amylovora*. Proc. of the 8th Int. Workshop on Fire Blight. Eds. Momol, M. T. & Saygili, H., Acta Hort. **489**: 321-326.
- Guan, L., Ehrmann, M., Yoneyama, H. & Nakae, T. (1999). Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. **274**: 10517-10522.
- Grayer, R. J. & Kokubun, T. (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. Phytochemistry **56**: 253-263.
- Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N. J., Paulsen, I. T. & Skurray, R. A. (1998). QacR is a repressor protein that regulates expression of the Staphylococcus aureus multidrug efflux pump QacA. J. Biol. Chem. **273**: 18665-18673.
- Grkovic, S., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (2002). Regulation of bacterial export systems. Microbiol. Mol. Biol. Reviews **66**: 671-701
- Haapa, S., Suomalainen, S., Eerikäinen, S., Airaksinen, M., Paulin, L. & Savilahti, H. (1999a). An efficient DNA sequencing strategy based on the bacteriophage Mu *in vitro* DNA transposition reaction. Genome Res. **9**: 308-315.
- Haapa, S., Taira, S., Heikkinen, E. & Savilahti, H. (1999b). An efficient and accurate integration of mini-Mu transposons *in vitro*: a general methodology for functional genetic analysis and molecular biology applications. Nucl. Acids Res. **27**: 2777-2784.
- Hagmann, K. E., Pan, W., Spratt, B. G., Balthazar, J. T., Judd, R. C. & Schafer, W. M. (1995). Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. Microbiology **141**: 611-622.

- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 575-607.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (2000). Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. (Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1102-1156.
- Hansen-Wester, I. & Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* **3**: 549-59.
- Harborne, J. B. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. System. Ecol.* **27**: 335-367.
- Hattingh, M. J., Beer, S. V. & Lawson, E. W. (1986). Scanning electron microscopy of apple blossoms colonized by *Erwinia amylovora* and *E. herbicola*. *Phytopathology* **76**: 900-904.
- Hauben, L., Moore, E. R. B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. & Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.* **21**: 384-397.
- Hayashi, S. & Wu, H. C. (1990). Lipoproteins in bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**: 451-71.
- Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **3**: 315-9.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-67.
- Hillen, W. & Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 345-69.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W. & Saenger, W. (1994). Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* **264**: 418-20.
- Hogue, D. L., Kerby, L. & Ling, V. (1999). A mammalian lysosomal membrane protein confers multidrug resistance upon expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**: 12877-12882.
- Holland, I. B. & Blight, M. A. (1999). ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**: 381-399.
- Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.

- Horwitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Tomson, A. J., DaRooge, M. A., Fisher, B. E., Mauricio, J. & Klundt, I. (1964). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**: 574-575.
- Huda, M. N., Morita, Y., Kurodo, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (2001). Na⁺-driven multidrug efflux pump VcmA from *Vibrio cholerae* non-01, a non-halophilic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**: 235-239.
- Huffmann, J. L. & Brennan, R. G. (2002). Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 98-106.
- Ishimaru, C. A., Klos, E. J. & Brubaker, R. R. (1988). Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology* **78**: 746-750.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. & Hirsh, D. (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8447-51.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A. L. & He, S. Y. (2001). Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **40**: 1129-1139.
- Jock, S., Donat, V., Lopez, M. M., Bazzi, C. & Geider, K. (2002). Following spread of fireblight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environ. Microbiol.* **4**: 106-114.
- Johnson, K. B. & Stockwell, V. O. (2000). Biological control of fire blight. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 319-337.
- Jones, A. L. & Schnabel, E. L. (2000). The development of Streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 235-251.
- Juliano, R. L. & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **455**: 152-162.
- Jumel, K., Geider, K. & Harding, S. E. (1997). The solution molecular weight and shape of the bacterial exopolysaccharides amylovoran and stewartan. *Int. J. Biol. Macromol.* **20**: 251-8.
- Kado, C. I. & Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-73.
- Kado, C. I. (2000). The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 643-468.

- Kearns, L. P. & Mahanty, H. K. (1998). Antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh1087: its role in inhibition of *Erwinia amylovora* and partial characterization of antibiotic biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1837-44.
- Kelley, L. A., Maccallum, R. & Sternberg, M. J. E. (1999). Recognition of remote protein homologies using three-dimensional information to generate a position specific scoring matrix in the program 3D-PSSM. In: Istrail S., Pevzner P., Waterman M. (ed.) *RECOMB 99, Proceedings of the Third Annual Conference on Computational Molecular Biology*. The Association for Computing Machinery, New York, New York. pp. 218-225.
- Kenyon, C. J. & Walker, G. C. (1980). DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2819-2823.
- Kim, J. F. & Beer, S. V. (2000). Hrp genes and harpins of *Erwinia amylovora* a decade of discovery. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 141-161.
- Kisker C., Hinrichs W., Tovar K., Hillen W., Saenger W. (1995). The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance. *J. Mol. Biol.* **247**: 260-80.
- Köhler, T., Pechere, J. C. & Plesiat, P. (1999). Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 771-778.
- Kokubun, T. & Harborne, J. B. (1995). Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the *Maloideae* (*Rosaceae*): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* **40**: 1649-1654.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S. & Aravind, L. (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 709-42.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**: 914-919.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M. 2nd & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-2.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-6.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580.

- Krummenacher, P. & Narberhaus F. (2000) Two genes encoding a putative multidrug efflux pump of the RND/MFP family are cotranscribed with an *rpoH* gene in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene* **241**: 247-254.
- Lam, E., Kato, N. & Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853.
- Llama-Palacios, A., Lopez-Solanilla, E. & Rodriguez-Palenzuela, P. (2002). The *ybiT* gene of *Erwinia chrysanthemi* codes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1624-30.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G. & Cole, S. P. C. (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* **167**: 3-23.
- Li, X.-Z., Ma, D., Livermore, D. M. & Nikaido, H. (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chmeother.* **38**: 1742-1752.
- Li, X.-Z., Nikaido, H. & Poole, K. (1995). Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chmeother.* **39**: 1948-1953.
- Li, X. Z. & Poole, K. (2001). Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 12-27.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. & Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-7.
- Lomovskaya, O. & Lewis., K. (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8938-8942.
- Lomovskaya, O., Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (2002). It takes three to tango. *Nat. Biotechnol.* **20**: 1210-2.
- Lopez-Sonilla, E., Garcia-Olmedo, F. & Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Inactivation of the *sapA* to *sapF* locus of *Erwinia chrysanthemi* reveals common features in plant and animal bacterial pathogenesis. *Plant Cell* **10**: 917-924.
- Lopez-Sonilla, E., Llama-Palacios, A., Collmer, A. Garcia-Olmedo, F. & Rodriguez-Palenzuela P. (2001). Relative effects on virulence of mutations in the *sap*, *pel*, and *hrp* loci of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 386-393.
- Lucas, C. E., Balthazar, J. T., Hagman, K. E. & Shafer, W. M. (1997). The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **179**: 4123-8.

- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H. & Hearst, J. E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**: 45-55.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. & Hearst, J. E. (1996). The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**: 101-112.
- MacDonald, R. E. & Bishop, C. J. (1952). Phloretin: an antibacterial substance obtained from apple leaves. *Canad. J. Bot.* **30**: 486-489.
- Magnet, S., Courvalin, P. & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3375-80.
- Mayr, U., Treutter, D., Santos-Buelga, C., Bauer, H. & Feucht, W. (1995). Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry* **38**: 1151-1155.
- Mazzariol, A., Tokue, Y., Kanegawa, T. M., Cornaglia, G. & Nikaido, H. (2000). High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 3441-3443.
- McManus, P. S. & Jones, A. L. (1994). Role of wind-driven rain, aerosols, and contaminated budwood in incidence and spatial pattern of fire blight in an apple nursery. *Plant Disease* **78**: 1059-1066.
- Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.
- Miller, H. J. (1984). *Erwinia amylovora* detection and its significance in survival studies. *Acta Hort.* **151**: 63-68.
- Miller, P. F. & Sulavik, M. C. (1996). Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 441-8.
- Miller, P. W. (1929). Studies of fire blight of apple in Wisconsin. *J. Agricult. Research* **39**, 579-621.
- Miller, T. D. & Schroth, M. N. (1972). Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. *Phytopathology* **62**: 1175-1182.
- Miller, W. G. & Lindow, S. E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene* **191**: 149-153.
- Mizuuchi, K. (1992). Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of Mu and other elements. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1011-1051.

- Mo, Y. Y. & Gross D. C. (1990). Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. J. Bacteriol. **173**: 5784-92.
- Moller, S., Croning, M.D.R., & Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. Bioinformatics **17**: 646-653.
- Momol, M. T. & Aldwinkle, H. S. (2000). Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 9-36.
- Moore, R. A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A. & Woods, D. E. (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. **43**: 465-70.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 1778-1782.
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (2000). NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is a Na(+)-driven multidrug efflux pump. J. Bacteriol. **182**: 6694-6697.
- Morrissey, J. P. & Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Reviews **63**: 708-724.
- Müller, K. O. & Börger, H. (1940). Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. **23**: 189-231.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. & Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. Nature **419**: 587-593.
- Murillo, J., Shen, H., Gerhold, D., Sharma, A., Cooksey, D. A. & Keen, N. T. (1994). Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23. Plasmid **31**: 275-287.
- Nakaune, R., Hamamoto, H., Imada, J., Akutsu & Hibi, T. (2002). A novel ABC transporter gene, *PMR5*, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. Mol. Genet. Genomics **267**: 179-185.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard — Fifth Edition. NCCLS document M07-A5.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**: 1-6.
- Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (1999). Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Engineering* **12**: 3-9.
- Nikaido, H., Basina, M., Nguyen, V. Y. & Rosenberg, E. Y. (1998). Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes those β -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* **180**: 4686-4692.
- Nikaido, H. & Zgurskaya, H. I. (2001). AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 215-8.
- Nishino, K. & A. Yamaguchi. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 5803-5812.
- Norelli, J. L. & Beer, S. V. (1984). Factors affecting the development of fire blight blossoms infections. *Acta Hort.* **151**: 37-39.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**: 449-60.
- Nüske, J. & Fritsche, W. (1989). Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. *J. Basic. Microbiol.* **29**: 441-7.
- Ohara, O., Dorit, R. L. & Gilbert, W. (1989) Direct genomic sequencing of bacterial DNA: the pyruvate kinase I gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6883-6887.
- Okusu, H., Ma, D. & Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**: 306-308.
- Orth, P., Schnappinger, D., Sum, P.-E., Ellestad, G. A., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs, W. (1999). Crystal structure of the Tet Repressor in complex with a novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxy-tetracycline. *J. Mol. Biol.* **285**: 455-461.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs W. (2000) Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 215-9.
- Osborn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Ouellette, M., Legare, D. & Papadopolou, B. (2001). Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 201-6.

- Palmer, E. L., Teviotdale, B. L. & Jones A. L. (1997). A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in *Erwinia amylovora*. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4604-4607.
- Palumbo, J. D., Kado, C. I. & Phillips, D. A. (1998). An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. J. Bacteriol. **180**: 3107-3113.
- Pau, S. S., Paulsen, I. T. & Saier Jr., M. H. (1998). Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Reviews **62**: 1-34.
- Paulin, J.-P. (2000). *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 9-36.
- Paulsen, I. T., Brown, M. H. & Scurry, R. A. (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Reviews **60**: 575-608.
- Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P.S. & Saier, M. H. Jr. (1997). A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **156**: 1-8.
- Paulsen, T. I., Nguyen, L., Sliwinski, M. K., Rabus, R. & Saier, M. S. Jr. (2000). Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes. J. Mol. Biol. **301**: 75-100.
- Paulsen, I. T., Cen, J., Nelson, K. E. & Saier, M. H. Jr. (2001). Comparative genomics of microbial drug efflux systems. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**: 145-50.
- Peng, W.-T. & Nester, E. W. (2001) Characterization of a putative RND-type efflux system in *Agrobacterium tumefaciens*. Gene **270**: 245-252.
- Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 2233-41.
- Poole, K. (2001a). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr. Opin. Microbiol. **4**: 500-508.
- Poole K. (2001b). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**: 255-64.
- Pradel, E. & Pages, J.-M. (2002). The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **46**: 2640-2643.
- Price, C. T. D., Lee, I. R. & Gustafson, J. E. (2000). The effects of salicylate on bacteria. Int. J. Biochem. Cell Biol. **32**: 1029-1043.

- Psallidas, P. G. & Tsiantos, J. (2000). Chemical control of fire blight. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 199-234.
- Putman, M., van Veen, H. W. & Konings, W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 672-93.
- Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P. & Segura, A. (1998). Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **80**: 3323-9.
- Reiter, W. D., Palm, P. & Yeats, S. (1989). Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. *Nucleic. Acids Res.* **17**:1907-14.
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E. & Goffeau, A. (2001). The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 207-14.
- Rosenberg, E. Y., Ma, D. & Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* **182**: 1754-6.
- Rouquette, C., Harmon, J. B. & Shafer, W. M. (1999). Induction of the *mtrCDE*-encoded efflux pump system of *Neisseria gonorrhoeae* requires MtrA, an AraC-like protein. *Mol. Microbiol.* **33**: 651-8.
- Saier, M. H. Jr., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* **11**: 841-847.
- Saier, M. H. Jr, Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C., Jack, D. L., Jahn, P. S., Lew, K., Liu, J., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Tseng, T. T. & Virk, P. S. (1999). The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 257-79.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, New York.
- Sanchez, L., Pan, W., Vinas, M. & Nikaido, H. (1997). The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **179**: 6855-6857.
- Sanchez-Fernandez, R., Ardile-Diaz, W., Van Montagu, M., Inze, D. & May, M. J. (1998). Cloning and expression analyses of *AtMRP4*, a novel MRP-like gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 655-662.

- Savilahti, H., Rice, P. A. & Mizuuchi, K. (1995). The phage Mu transpososome core: DNA requirements for assembly and function. *EMBO J.* **14**: 4893-4903.
- Schlösser, E. (1983). *Allgemeine Phytopathologie*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schoonbeek, H., Del Sorbo, G. & De Waard, M. A. (2001). The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 562-571.
- Schuldiner, S., Granot, D., Steiner, S., Ninio, S., Rotem, D., Soskin, M. & Yerushalmi, H. (2001). Precious things come in little packages. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 155-62.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. & Brennan, R. G. (2001). Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* **294**: 2158-63.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. & Brennan, R. G. (2002). Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO J.* **21**: 1210-8.
- Seemueller, E. A. & Beer, S. V. (1976). Absence of cell wall polysaccharide degradation by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **66**: 433-436.
- Seidel, M., Steffen, E., Seidel, D. & Walter, A. (1994). Survival of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. on bird feet. *Arch. Phytopathol. Plant Protection* **29**: 25-27.
- Shafer, W. M., Veal, W. L., Lee, E. H., Zarantonelli, L., Balthazar, J. T. & Rouquette, C. (2001). Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 219-24.
- Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C. & Luisi, B. (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5011-5026.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C. & Holden, D.W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 2593-7.
- Shiomi, N., Fukuda, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1991). Nucleotide sequence and characterization of gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 211-215.
- Sjulin, T M. & Beer S. V. (1977). Mechanism of wilt induction by amylovorin in cotoneaster shoots and its relation to wilting of shoots infected by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* **68**: 89-94.

- Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K., Schenk, A. & Ullrich, M. S. (2001). Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Arch. Microbiol.* **176**: 393-399.
- Sobiczewski, P., Chiou, C.-S. & Jones, A. L. (1991) Streptomycin-resistant epiphytic bacteria and homologous DNA for streptomycin resistance in Michigan apple orchards. *Plant Disease* **75**: 1110-1113.
- Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Science* **3**: 86-90.
- Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., DiDomenico, B., Shaw, K. J., Miller, G. H., Hare, R. & Shimer, G. (2001). Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1126-36.
- Tikhonova, E. B., Wang, Q. & Zgurskaya, H. I. (2002). Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **184**: 6499-507.
- Thomson, S. V. (1986). The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology* **76**: 476-482.
- Thomson, S. V. (2000). Epidemiology of Fire Blight. In: Vanneste, J. L. (ed.) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Oxon, pp. 9-36.
- Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. & Saier, M. H. Jr. (1999). The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 107-25.
- Tusnády, G. E. & Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: applications to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**: 489-506.
- Tusnády, G. E. & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**: 849-850.
- Treutter, D. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation* **34**: 71-89.
- Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**: 339-43.

- Ullrich, M., Penaloza-Vazquez, A., Bailey, A. M. & Bender, C. L. (1995). A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J. Bacteriol.* **157**: 6160-6169.
- Urban, M., Bhargava, T. & Hamer, J. E. (1999). An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* **18**: 512-521.
- van Bambeke, F., Balzi, E. & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* **60**: 457-470.
- van der Zwet, T. & Keil, H. L. (1979). *Fire blight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants*. United States Department of Agriculture Handbook 510, Washington DC 20250.
- van der Zwet, T. & Beer, S. V. (1995). *Fire blight – Its Nature, Prevention, and Control: A Practical Guide to Integrated Disease Management*. United States Department of Agriculture, Agriculture Information Bulletin No. 631, Washington DC 20250.
- van Etten, H., Temporine, E. & Wasmann, C. (2001). Phytoalexin (and Phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**: 83-93.
- van Gijsegem, F. (1997). In planta regulation of phytopathogenic bacteria virulence genes: relevance of plant-derived signals. *Europ. J. Plant Pathol.* **103**: 291-301.
- van Telling, O. (2001). The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology. *Toxicology Letters* **120**: 31-41.
- van Veen, H. W., Margolles, A., Müller, M., Higgins, C. F. & Konings, W. N. (2000). The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *EMBO J.* **19**: 2503-2514.
- Vanneste, J. L., Yu, J. & Beer, S. V. (1992). Role of antibiotic production by *Erwinia herbicola* Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.* **174**: 2785-96.
- von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225**: 487-494.
- Walker, G. C. (1995). SOS responses and DNA damage tolerance in prokaryotes. In *DNA repair and Mutagenesis*, E. C. Friedberg, G. C. Walker, and S. Siede, eds (Washington, DC: American Society of Microbiology Press), pp 407-464.
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **406**: 775-781.
- Wang A.-Y., Grogan D.W., Cronan J.E. Jr. (1992): Cyclopropane fatty acid synthase of *Escherichia coli*: deduced amino acid sequence, purification, and studies of the enzyme active site. *Biochemistry* **31**: 11020-11028.

- Wang, H., Dzink-Fox, J. L., Chen, M. & Levy, S. B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: Role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1515-1521.
- Weaver, J.C. (1993). Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J. Cell. Biochem.* **51**: 426-35.
- Wei, Z.-M., Sneath, B. J. & Beer, S. V. (1992). Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* **174**: 1875-1882.
- Wei, Z. & Beer, S. V. (1995). HrpL activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamilie of σ -factors. *J. Bacteriol.* **177**: 6201-6210.
- Wei, Z., Kim, J. F. & Beer, S. V. (2000). Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1251-1262.
- Williams, KP. (2002). Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies. *Nucleic Acids Res.* **30**: 866-75.
- Wilson, K. J., Sessitsch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D. L. & Jefferson, R. A. (1995). Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**: 1691-1705.
- Wilson, M., Epton H. A. S. & Sigee, D. C. (1989a). *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom. II. The anther. *J. Phytopathol.* **127**: 1-14.
- Wilson, M., Epton H. A. S. & Sigee, D. C. (1989b). *Erwinia amylovora* infection of hawthorn blossom. II. The stigma. *J. Phytopathol.* **127**: 15-28.
- Wilson, M. & Lindow, S. E. (1993). Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* **83**: 117-123.
- Winans, S. C., Mantis, N. J., Chen, C. Y., Chang, C. H. & Han, D. C. (1994). Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Res. Microbiol.* **145**: 461-73.
- Winkelmann, G., Lupp, R. & Jung, G. (1980). Herbiccolins-New peptide antibiotics from *Erwinia herbicola*. *J. Antibiot.* **33**: 353-8.
- Wodzinski, R. S. & Paulin, J. P. (1994). Frequency and diversity of antibiotic production by putative *Erwinia herbicola* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 603-607.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**: 681-92.

- Wong, K. K., Brinkman, F. S. Benz, R. S. & Hancock, R. E. (2001). Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **183**: 367-374.
- Wright, S. A., Zumoff, C. H., Schneider, L. & Beer, S. V. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 284-92.
- Yang, Y. O., Shah, J. & Klessig, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense response. *Genes Dev.* **11**: 1621-1639.
- Zeller, W. (1974). Der Feuerbrand des Kernobstes. *Mitteilungen Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.* **158**: 121 pp.
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. & Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2751-2755.
- Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (1999). AcrA is highly assymetrical protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285**: 409-420.
- Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* **37**: 219-225.